

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

SISBI/UFU



1000220662

MON
54
P667d
TES/mem.

**Determinação catalítica de selênio em cabelo humano
empregando a redução de TAN a DHTAN com íon brometo
como ativador em sistema de AFCM com detecção
espectrofotométrica**

Natal Junio Pires

Dissertação de Mestrado em Química,
apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras

Uberlândia – MG
2005



Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

e-mail: posquimica@ufu.br

Fone/Fax: 3299-1200

ALUNO: NATAL JUNIO PIRES

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5021444-3

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Determinação catalítica de selênio em cabelo humano empregando a redução de TAN e DHTAN com brometo como ativador e o sistema AFCM com detecção espectrofotométrica”

ORIENTADOR: PROF. DR. SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro da Biblioteca do Campus Santa Mônica no dia 02 de fevereiro de 2005 às 14:30 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof. Dr. João Marcos Madurro
(Universidade Federal de Uberlândia)

Prof. Dr. Efraim Lázaro Reis
(Universidade Federal de Viçosa)

Uberlândia, 02 de fevereiro de 2005.

*A ciência não conhece nenhum país,
porque o conhecimento pertence a humanidade,
e é a tocha que ilumina o mundo.
A ciência é a mais alta personificação da nação,
porque essa nação permanecerá, e é a primeira que
carrega adiante os trabalhos do pensamento e da
inteligência.*

Louis Pasteur

*Aos meus queridos pais Raimundo e Antônia,
querido irmão Ronaldo,
a minha linda princesinha Angelina
e a minha adorável companheira Meire.*

Pela felicidade de ter uma família tão especial

Dedico

*Ao meu orientador Sebastião e
co-orientador Welington, responsáveis
pela minha formação e pelo enorme desejo
de fazer pesquisa em Química.*

Pela felicidade de ter uma família científica tão especial.

Dedico

*Ao meu inestimável amigo Ricardo Alexandrino,
pela força e confiança que deposita em mim.*

Pela felicidade de ter um amigo tão dedicado.

Dedico

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras pela orientação, amizade e apoio durante o desenvolvimento do presente trabalho e outros projetos.

Ao Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz pela orientação, pelo exemplo de respeito e de obstinação para conseguir encontrar intuitivamente as soluções de problemas.

À Prof^a. Dr^a. Nívea M. M. Coelho, por ter cedido tão gentilmente alguns equipamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Efigênia Amorim, pelas importantes contribuições ao texto final da dissertação e por ter contribuído aceitando participar do Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. João Marcos Madurro, pelas contribuições e pelos questionamentos feitos durante o Exame de Qualificação.

Aos demais docentes da Área de Química Analítica do IQ-UFU, pela amizade, pelos ensinamentos oferecidos e convivência durante os últimos anos.

À todos os docentes do IQ-UFU pela sólida formação em Química, que me permitiu ingressar com segurança no Programa de Pós-Graduação.

Aos meus pais, meu irmão e a minha filha, aqui me desculpo e agradeço por suportarem minha ausência enquanto estive envolvido em mais este projeto.

À Meire, minha eterna companheira, pela paciência, apoio e carinho irrestritos durante todos os momentos.

Ao amigo Francislei Alves Neto, pela amizade e pelas discussões sobre a beleza que existe na ciência e os questionamentos sobre “o que estamos fazendo para contribuir com a sociedade?”.

Ao amigo Lucas Caixeta Gontijo, por ter aceitado minhas sugestões na parte inicial de seu projeto de pesquisa.

Ao amigo Jader Oliveira pela dedicação, ensinamento e trabalho durante a graduação, assim como em outros momentos.

Ao amigo Helieder Cortes Freitas, pelas discussões a respeito dos projetos de pesquisa.

Ao pesquisador Shigenori Nakano, do Departamento de Ciências Ambientais da Universidade de Tottori no Japão, pela excelente discussão sobre o emprego de ativadores em reações catalíticas.

Ao pesquisador William B. Euler, do Departamento de Química Inorgânica, Polímeros, Sensores e Materiais da University Rhode Island em Kingston Estados Unidos, pelo artigo (separata) que gentilmente me foi enviado.

Aos amigos do LSPc, Alex, Alisson, Edson, Fábio, Francislei, Helieder, Juraci, Rodrigo, Wércio pela convivência harmoniosa, pelas discussões científicas e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos colegas de trabalho Mauro Luiz Begnini e Sebastião Francelino da Cruz pelo constante apoio durante a redação desta dissertação.

Ao amigo Ildo do Laboratório de Análises do IQ-UFU pelo suporte material concedido.

Aos amigos da biblioteca da UFU - Campus Santa Mônica, sempre atenciosos e muito eficientes.

À amiga Isabel da Secretaria de Pós-Graduação do IQ-UFU, pelo atendimento cordial e eficiente oferecido durante o Mestrado.

A Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UFU pelo apoio financeiro que permitiu minha participação em um relevante encontro científico.

A Capes pela bolsa fornecida durante a realização deste projeto.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

Resumo	xi
Abstract	xii
I) INTRODUÇÃO	1
I.1) Elementos traço e sua importância em organismos vivos	1
I.2) Selênio	3
I.2.1) Introdução e histórico	3
I.2.2) Propriedades físicas, químicas, ocorrência e usos	8
I.3) Métodos cinéticos de análise	13
I.3.1) Introdução	13
I.3.2) Bases matemáticas de métodos catalíticos	15
I.4) Análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM)	21
I.5) Sistema reacional	23
I.6) Cabelo como matriz para determinação de elementos traço	25
II) OBJETIVOS	27
III) PARTE EXPERIMENTAL	28
III.1) Instrumentação	28
III.2) Coleta e tratamento das amostras	31
III.2.1) Coleta	31
III.2.2) Lavagem da amostra	31
III.2.3) Solubilização da amostra	32
III.2.4) Redução de Se(VI) para Se(IV) com HCl	32
III.2.5) Tratamento dos interferentes	33
IV) RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
IV.1) Espectros de absorção	34
IV.2) Avaliação da variação do sinal com o tempo	35
IV.3) Redução do TAN a DHTAN no sistema de AFCM	37
IV.4) Avaliação do tamanho da bobina de reação	38
IV.5) Avaliação do tamanho da alça de amostragem	38
IV.6) Influência da concentração de HCl no meio reacional	39
IV.7) Otimização da concentração de H_3PO_2 e glioxal na redução do TAN a DHTAN	41
IV.8) Avaliação do íon brometo como ativador	55

IV.9)	Estudo de precisão ao longo da curva de calibração	59
IV.10)	Estudo de íons interferentes	59
IV.11)	Eliminação dos interferentes	62
IV.12)	Aplicação do método a amostras de cabelo	65
IV.12.1)	Preparação da amostra	65
IV.12.2)	Análise de cabelo e tratamento estatístico	67
V)	CONCLUSÕES	73
VI)	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	75
VII)	APÊNDICES	76
VII.1)	APÊNDICE 1	76
VII.1.1)	Síntese do DAP– Primeiro Método	76
VII.1.2)	Síntese do DAP – Segundo Método	76
VII.2)	APÊNDICE 2 – Preparações e Purificações	78
VII.2.1)	Preparo de soluções - Soluções de trabalho	78
VII.2.2)	Preparo de soluções - Soluções dos interferentes	79
VII.2.3)	Purificação do 1,2-diaminobenzeno (<i>o</i> -fenilenodiamina → <i>o</i> -PD)	79
VII.3)	APÊNDICE 3	81
VII.4)	APÊNDICE 4	84
VII.4.1)	Comparação entre dois coeficientes angulares	84
VII.4.2)	Comparação entre dois coeficientes lineares	86
VIII)	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Resumo

Um método espectrofotométrico para determinação de selênio em cabelo humano foi desenvolvido empregando um sistema de análise em fluxo contínuo monossegmentado e o efeito catalítico de Se (IV) na redução do 1,4,6,11-tetrazanaftaceno a 1,6-diidro-1,4,6,11-tetrazanaftaceno na presença de glioxal e ácido hipofosforoso. Para esta reação, efetuada a 50 °C o íon brometo foi utilizado como ativador da ação catalítica do Se (IV). A reação química foi monitorada pelo indicador 1,6-diidro-1,4,6,11-tetrazanaftaceno, tendo-se medidas de transmitância a $\lambda_{\text{máx}} = 600 \text{ nm}$. A curva de calibração para Se (IV), descrita pela equação $\Delta\text{Abs} = 1,173C_{\text{Se(IV)}} + 0,0014$ ($r^2 = 0,9993$), apresenta linearidade até 0,12 $\mu\text{g/mL}$ com limite de detecção de 2,6 ng/mL . Na determinação de selênio são interferentes os íons Cu (II), Fe (III), Mn (II), Zn (II) e V (V). Níveis de recuperação aceitáveis de Se (IV) foram obtidos pelo uso apropriado de adição de um padrão de Se (IV). A precisão e exatidão do método proposto foram estimadas usando um protocolo estatístico baseado na metodologia de adição padrão. A determinação de selênio em cabelo humano empregando o método proposto permitiu verificar que o mesmo é simples, prático e satisfatório para uso em rotina.

Abstract

A method spectrophotometric to determination of selenium in human hair was developed using the continuous monosegmented flow analysis with the catalytic effect of Se (IV) in the reduction of the 1,4,6,11-tetraazanaphthacene to 1,6-dihydro-1,4,6,11-tetraazanaphthacene in presence of the glyoxal and hypophosphorous acid. For this reaction the bromide ion was used as activator of the catalytic action of the Se (IV). The reaction was made the 50 °C and the indicator of the reaction 1,6-dihydro-1,4,6,11-tetraazanaphthacene was monitored by transmittance measures to 600 nm. The calibration curve for Se (IV) described by the equation $\Delta\text{Abs} = 1,173C_{\text{Se(IV)}} + 0,0014$ ($r^2 = 0,9993$) is linear to 0.12 µg/mL and the limit of detection is 2.6 ng/mL. The ions Cu (II), Fe (III), Mn (II), Zn (II) e V (V) are interferences in the selenium determination. Acceptable recovery levels of Se (IV) were obtained by the appropriate use of addition of a pattern of Se (IV). The precision and accuracy of the proposed method were valued using a statistical protocol based on the methodology of addition pattern. The selenium determination in human hair using the proposed method allowed verifying that the same is simple, practical and satisfactory for use in routine.

I) INTRODUÇÃO

I.1) ELEMENTOS TRAÇO E SUA IMPORTÂNCIA EM ORGANISMOS VIVOS

"An element is considered essential if a deficiency leads to deficiency syndromes (physiological and structural deviations) in a reproducible way and if administration of the element prevents or cures the deviation. The symptoms of deficiency can vary from a decrease in element-specific biochemical functions through clinical symptoms to death."⁽¹⁾

Vandecasteele, C. & Block, C. B

Os elementos metálicos, semimetálicos e não metálicos, nas formas iônica, livres ou associados a outras espécies químicas, estão presentes nos sistemas biológicos e são de grande importância para a manutenção do bom funcionamento dos organismos vivos. Alguns desses elementos são considerados essenciais, pois algumas patologias são consequência da baixa ingestão desses nutrientes, e os sintomas são minimizados ou até eliminados através de suplementação alimentar.⁽²⁾

Atualmente, cerca de 24 elementos (H, C, N, O, Mg, P, S, Cl, K, F, Si, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Sn e I) são reconhecidos como essenciais para a vida humana, sendo que 11 deles (Co, Cu, Cr, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V e Zn) estão presentes em baixas concentrações (menos de 7g em um indivíduo de 70 kg) e, por isso, são denominados elementos traço. A maioria desses elementos são cofatores[‡] de enzimas que participam de importantes eventos biológicos, tais como o transporte de oxigênio, o combate à formação de radicais livres, a organização estrutural de macromoléculas e a atividade hormonal.⁽³⁾ Em contraste com esse papel benéfico dos elementos essenciais à saúde, é possível contrapor a toxicidade e os efeitos maléficos de elementos como cádmio, chumbo e mercúrio.⁽²⁾

Normalmente, os intervalos de concentração que determinam a carência, a essencialidade e a toxicidade desses elementos são extremamente curtos⁽¹⁾ (Figura 1). Por esse motivo, é necessário conhecer a concentração dos elementos

[‡] Íon inorgânico ou coenzima (cofator orgânico) indispensável ao desempenho de certas enzimas. Um exemplo é o papel desempenhado pelo selênio junto a enzima glutathione peroxidase.

essenciais em amostras de interesse clínico com adequada precisão e exatidão, o que exige o desenvolvimento e aprimoramento de procedimentos analíticos aplicados a esse tipo de análise.

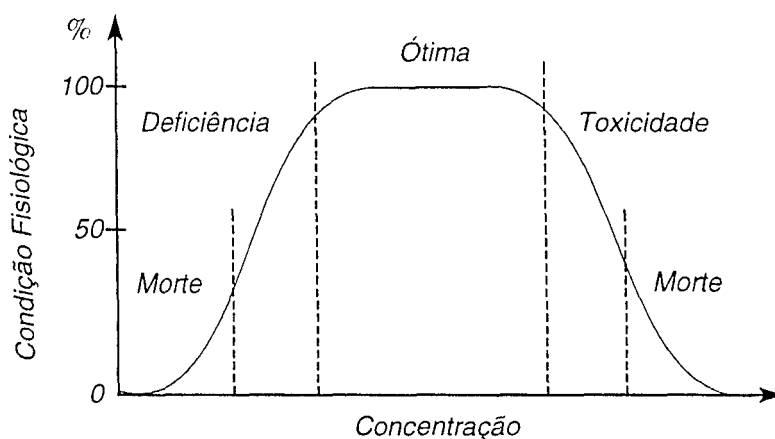


Figura 1 - Variação da condição fisiológica de um organismo humano em função da concentração dos elementos traço essenciais.⁽¹⁾

Assim, é claro e evidente que a determinação de elementos traço essenciais em amostras biológicas é importante para o entendimento da fisiologia, conseguir-se um diagnóstico e selecionar um tratamento apropriado da doença. O método analítico requerido assim como as suas características de desempenho (limite de detecção, exatidão e precisão, velocidade, etc.) dependem do elemento de interesse, concentração na matriz (sangue e soro sanguíneo; órgãos como pulmões, fígado e rins; fluídos biológicos como, por exemplo, urina; cabelo, etc.), variabilidade desta concentração e do número de amostras a ser analisado.

I.2) SELÊNIO

I.2.1) INTRODUÇÃO E HISTÓRICO

“There is a rather narrow range of adequacy of several essential elements such as Se in most organisms. Smaller concentrations result in different abnormalities because of pertinent specific biochemical changes. Higher concentrations result in toxicity.”⁽⁴⁾

Alaejos, M. S. & Romero, C. D.

O selênio é um elemento traço essencial, mas é tóxico em altas concentrações no organismo. Ele é essencial em baixas concentrações e tóxico em níveis relativamente altos, sendo que a faixa que define a essencialidade e a toxicidade é muito estreita. Para humanos esta faixa compreende entre 0,8 – 1,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$.⁽⁵⁾ No meio ambiente, a concentração de selênio pode ser: 0,09 ng/mL em água do mar, mas em água doce este valor é bem menor; na atmosfera 1 ng/mL e cerca de 80 $\mu\text{g/g}$ em solos. A quantidade de selênio necessária ao corpo humano é de 0,050-0,200 mg/dia e a concentração máxima de selênio aceitável na água para consumo é de 10 $\mu\text{g/L}$ ⁽⁶⁾, enquanto que no Brasil, os níveis de potabilidade da água para consumo humano permite um nível de 0,1 mg de selênio por litro, conforme estabelecido na portaria 36 do Ministério da Saúde. O interesse sobre o estudo do efeito do selênio nos seres vivos começou primeiramente devido à sua toxicidade.⁽⁷⁾ Relatos sobre os efeitos adversos do excesso de selênio no organismo de animais têm sido realizados desde 1295, quando o explorador Marco Polo, viajando pela China, observou que “os cascos de seu gado tornaram-se inchados e gotejantes quando eles pastavam plantas crescentes em certas áreas”. Um cirurgião do exército dos EUA, Dr. Madison relatou em 1856 que animais do regimento da cavalaria alojados em Nebraska, atualmente estado de Dakota do Sul, sofreram “perda de pêlos da crina e cauda depois de pastarem nos arredores de uma montanha”. Em 1934 verificou-se que os níveis elevados de selênio em plantas de regiões semi-áridas do oeste norte-americano eram responsáveis por uma moléstia, chamada de “doença alcalina”, que acometeu o gado e outros animais de criação.⁽⁵⁾ Esta enfermidade era caracterizada por um certo tipo de paralisia, perda de pêlo e dentes, unhas quebradiças e desprendimento do

casco, idêntica àquela relatada anteriormente. A toxicidade por selênio pode ainda causar falhas na reprodução, como, por exemplo, a má formação de embriões. Atualmente, sabe-se que devido a sua similaridade química com o enxofre, o selênio pode interferir no metabolismo deste, sendo incorporado em aminoácidos como cisteína, cistina e metionina, alterando a estrutura de proteínas como a queratina, resultando em mudanças estruturais nos cabelos e unhas. Em casos agudos de intoxicação, são verificados distúrbios relacionados com o sistema nervoso central, além de afetar o fígado, retardar o crescimento e levar a infertilidade. Os sinais mais comuns de selenose crônica em seres humanos são unhas e cabelos quebradiços, gosto metálico na boca e odor de alho exalado durante a respiração e transpiração. Estes sintomas estão relacionados a uma ingestão diária de 5 mg de selênio para um indivíduo adulto.⁽⁷⁾

A importância do selênio na nutrição animal foi descoberta por Schwarz e Foltz em 1957. Eles observaram que a adição de selênio na dieta de ratos com deficiência de vitamina E evitava a necrose do fígado. Em um outro estudo eles verificaram que um certo composto orgânico específico de selênio (Fator 3^s) possuía atividade metabólica várias vezes mais potente que o selênio inorgânico e outras formas orgânicas conhecidas de selênio. Ao contrário do que se pensava, foi comprovado que o efeito protetor contra a necrose de fígado, antes atribuído somente à L-cisteína, é, na verdade, produzido por um efeito sinérgico entre a L-cisteína e o Fator 3, presente como contaminante em quantidades muito baixas neste aminoácido. Quando associado à vitamina E, o selênio tem ação protetora quanto a peroxidação lipídica.⁽⁸⁾

Embora a importância deste elemento traço na nutrição animal tenha sido revelada em 1957, pouco ainda se sabe sobre o papel específico do selênio no organismo. As primeiras funções do selênio nos seres humanos só foram explicadas em 1973. Até os dias de hoje só se conhecem três reações catalisadas por enzimas que exigem a participação de proteínas contendo selênio. Duas destas reações se relacionam com bactérias, uma necessita da enzima desidrogenase e outra da glicina redutase.⁽⁷⁾ A terceira é a da glutatona peroxidase (GPx)⁽⁹⁾, uma enzima que contém um átomo de selênio ligado covalentemente na forma de selenocisteína (figura 2) que é essencial para sua atividade, e protege os glóbulos vermelhos, membranas celulares e componentes intracelulares contra reações indesejáveis com peróxidos solúveis.

^s Composto de selênio de ocorrência natural e que atua na prevenção da necrose de fígado em ratos. Embora ele não esteja totalmente identificado, sabe-se hoje que ele é formado principalmente de selenometionina.

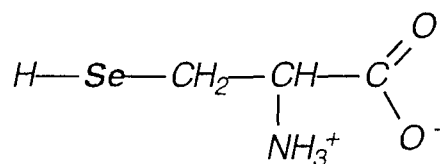


Figura 2 – Fórmula estrutural da selenocisteína um importante aminoácido constituinte da enzima glutathione peroxidase (GPx).

A ação antioxidante do selênio indica que este elemento pode desempenhar um relevante papel na prevenção do câncer. Essa ação preventiva ocorre principalmente devido ao papel desempenhado pelo selênio no fígado, local onde compostos carcinogênicos são metabolizados através de um conjunto de oxidases. Conforme mencionado anteriormente, o selênio é um elemento importante para a produção bioquímica da enzima glutathione peroxidase (GPx), responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio (figura 3), evitando a proliferação dos radicais livres nos organismos vivos.^(2,3)

A deficiência de selênio, além de aumentar a probabilidade do desenvolvimento de certos tipos de câncer, está associada a uma patologia observada na China, devido aos baixos níveis de selênio no solo daquela região: a doença de Keshan, que é uma cardiomiopatia verificada em crianças e mulheres jovens, que atinge aproximadamente 10 milhões de pessoas. A administração de suplementos alimentares ricos em selênio é o mais eficiente modo de prevenção dessa patologia.^(4,10,11) A ingestão de fontes alimentares ricas em selênio tais como o atum, arenque (uma espécie de peixe marinho migratório), levedo de cerveja, germe de trigo, brócoli, cebola, abóbora, moranga e tomate de áreas seleníferas atuam de modo preventivo.⁽¹²⁾

O selênio também afeta a toxicidade do mercúrio, protegendo o organismo contra os efeitos nocivos desse metal. A redução da toxicidade do mercúrio pode ser atribuída à ação antioxidante do selênio, que minimiza os danos causados pelos radicais livres gerados pelo mercúrio nas membranas celulares.⁽²⁾ A descoberta da GPx abriu as portas para a compreensão de como o selênio é um agente de proteção contra o câncer, doenças cardíacas e artrite.⁽⁷⁾

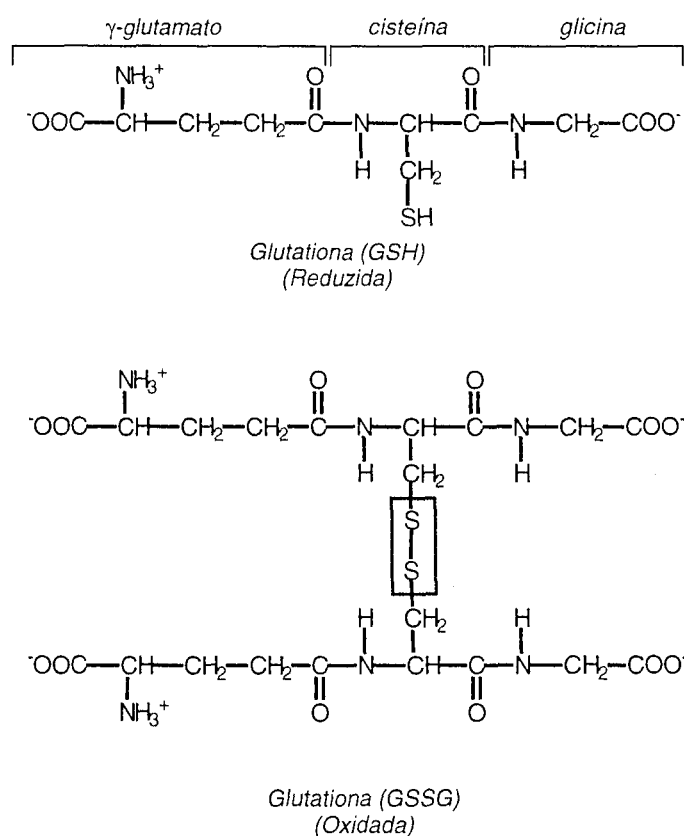
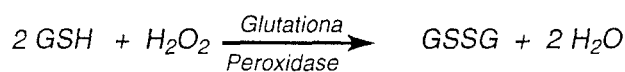


Figura 3 - Reação de oxidação da glutathione pelo peróxido presente no organismo.⁽⁹⁾

Em 1994 Taylor *et al.*⁽¹³⁾ demonstraram que vários novos genes no HIV codificam proteínas contendo selenocisteína, o que normalmente leva ao término da síntese da proteína. Apesar de que ainda nada se tenha comprovado, suspeita-se de que tais genes poderão fornecer a base de um papel para o selênio na bioquímica e regulação do HIV. Assim, alguns autores consideram a possibilidade de uma correlação entre a progressão do quadro infeccioso de um paciente soro positivo e a diminuição drástica dos níveis de selênio no mesmo indivíduo.⁽¹³⁾

Informações sobre o metabolismo do selênio são escassas. A absorção de selênio pelo intestino, sua retenção e distribuição variam com a espécie e parece depender da solubilidade do composto de selênio ingerido. Ainda faltam dados sobre seres humanos, porém, sabe-se que a interação entre os compostos de selênio e os grupos sulfidrilas, em

particular aqueles presentes na membrana celular, oferece interessantes possibilidades para elucidar o metabolismo do selênio. Isso foi comprovado por meio de um estudo realizado com plantas e microorganismos, que sugere uma competição entre o selênio e o enxofre para o transporte do elemento através da membrana celular. O selênio absorvido é depositado em quantidades variáveis ao longo de todos os tecidos do corpo, com exceção do tecido adiposo. Os níveis mais elevados são encontrados nos rins, fígado, coração e baço.⁽⁷⁾

Como mencionado anteriormente, tanto a deficiência quanto o excesso de selênio nos mamíferos, pode levar a sérios problemas de saúde. Por essa razão, surgiu a necessidade de se adquirir informações sobre o conteúdo de selênio nas mais diversas matrizes e aqui as matrizes biológicas têm grande importância como diagnóstico dos níveis de selênio no organismo. Existe uma demanda crescente de métodos para a determinação de selênio a níveis de traços em diferentes amostras tais como águas ou materiais biológicos.

Diferentes métodos têm sido relatados para determinação de selênio. Os métodos mais comumente empregados estão baseados em medidas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas de piazoselenol formado pela reação de Se(IV) com 2,3-diaminonaftaleno. Geração de hidreto, plasma indutivamente acoplado (ICP), espectrometria de emissão atômica e espectrometria de absorção atômica são também outras técnicas sensíveis que tem sido propostos e empregados na determinação de selênio. Mas, na geração de hidreto, coexistem íons que causam interferências. Análise por ativação de nêutrons (NAA), técnicas cromatográficas, voltamétricas, ICP-MS, espectrometria de fluorescência de raios-X e métodos cinéticos de análise tem sido desenvolvidos para a determinação de selênio. Alguns desses métodos dão boa sensibilidade, mas requerem equipamentos de custo elevado. Outros não possuem sensibilidade suficiente para determinação de selênio em certas amostras.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

I.2.2) PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS, OCORRÊNCIA E USOS

O selênio (Se), número atômico 34, massa atômica 78,96 u, é um membro do grupo 16 da tabela periódica pertencendo à família dos calcogênios. Posicionado entre o enxofre (S), um não-metal e o telúrio (Te), um metalóide; o selênio apresenta propriedades não-metálicas. O selênio ocorre naturalmente como seis isótopos estáveis: ^{74}Se (0,9 %), ^{76}Se (9,0 %), ^{77}Se (7,6 %), ^{78}Se (23,5 %), ^{80}Se (49,8 %), e ^{82}Se (9,2 %). Ele é 66º elemento na ordem de abundância na crosta terrestre, com uma concentração média de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$.⁽¹⁷⁾

O selênio foi descoberto em 1817 por Berzelius em depósitos formados nas câmaras de chumbo que produziam ácido sulfúrico (H_2SO_4) a partir de piritas de cobre (CuS_2). O nome selênio é derivado da palavra grega *selēnē* significando lua e que reflete sua proximidade com o telúrio que vem do latim *tellus* significando terra e descoberto aproximadamente 20 anos mais cedo.⁽¹⁸⁾

O selênio é um subproduto da extração de metais como cobre, zinco e chumbo e tem muitas aplicações industriais baseadas em suas propriedades físico-químicas. Suas propriedades semicondutoras assim como sua variação de condutibilidade elétrica induzida pela luz é de particular interesse.

A condutibilidade elétrica do selênio é fortemente dependente de sua pureza. Desta maneira sua condutibilidade pode ser consideravelmente aumentada por traços (poucos mg kg^{-1}) de íons haletos ou pela formação de ligas com elementos como telúrio ou arsênio. Devido às suas propriedades elétricas serem sensíveis à presença de defeitos cristalinos, a pureza do selênio pode ser deliberadamente controlada por dopagem ou formação de ligas com outros elementos, tendo esse controle um importante papel em seu uso em processos eletro-eletrônicos.⁽¹⁹⁾

Algumas propriedades físicas importantes do selênio estão resumidas na tabela 1.⁽¹⁷⁾

Tabela 1 – Propriedades físicas importantes do selênio.

Número atômico	34
Distribuição eletrônica	$[Ar] 3d^{10} 4s^2 4p^4$
Massa atômica relativa (u)	78,96
Estados de oxidação	-II, 0 , +IV, +VI
Raio atômico, nm	0,140
Raio iônico, nm	
Se ²⁻	0,191
Se(IV)	0,050
Se(VI)	0,042
Energia de ionização, kJ/mol	940
Potencial de ionização, eV	
I	9,75
II	21,5
Eletronegatividade (Pauling)	2,4
Densidade a 25 °C, g/cm ³	
Hexagonal	4,189
α -Monoclínico	4,389
Vítreo	4,285
Líquido (490 K)	3,975
Ponto de fusão, °C	217
Ponto de ebulição, °C (101.3 kPa; 760 mm Hg)	684,7 ($\pm 0,03$)
Resistividade elétrica, Ω/cm^*	
25 °C	10^{10}
400 °C	$1,3 \times 10^5$
Temperatura de transição vítrea, °C	30,2**

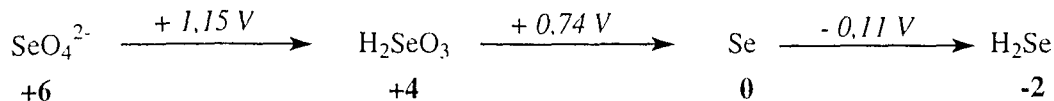
* Fortemente dependente da pureza e intensidade de luz.

** Fortemente dependente da pureza.

As propriedades químicas do selênio são intermediárias entre aquelas do enxofre e aquelas do metalóide telúrio. Em seus compostos, esse elemento exibe os estados de oxidação -II, +IV e +VI. O estado de oxidação +VI é consideravelmente menos estável do que no enxofre e, em soluções ácidas é

obtido apenas pela ação de agentes oxidantes fortes tais como cloro ou peróxido de hidrogênio. Selenato(VI) é mais facilmente obtido por oxidação em solução alcalina. Os potenciais de oxirredução do selênio em meio ácido e básico estão apresentados na figura 4.⁽¹⁹⁾

Em solução ácida



Em solução básica

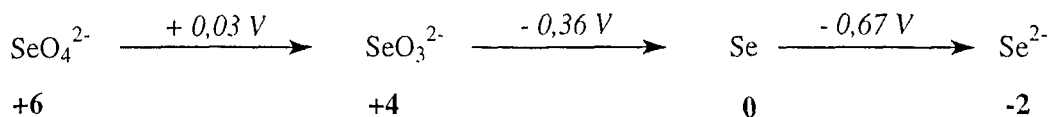
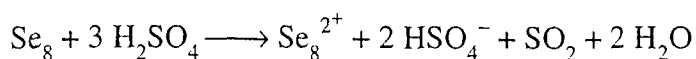


Figura 4 – Potenciais de redução para diferentes espécies de selênio em meio ácido e básico.⁽¹⁹⁾

Selênio queima ao ar para formar dióxido de selênio, que tem um cheiro de rabanete podre. Selênio é oxidado por ácido nítrico a ácido selenoso (H_2SeO_3). Nenhuma reação ocorre entre selênio elementar e agentes não oxidantes, tal como o ácido clorídrico. Ácido sulfúrico a quente dissolve selênio, dando origem a um polímero de cátions de selênio com coloração verde, conforme é apresentado a seguir:⁽¹⁷⁾



Com cloro, ocorre uma oxidação vigorosa para tetracloreto de selênio. Selênio reage também com elementos eletropositivos para formar selenetos (Se^{2-}) e com grandes poderes corrosivos, principalmente em altas temperaturas. Com hidrogênio, o gás tóxico seleneto de hidrogênio (H_2Se) é formado. Selênio combina com enxofre para formação compostos não estequiométricas. Em soluções fortemente alcalinas ele se dissolve sofrendo desproporcionamento para seleneto e selenito.⁽¹⁷⁾

Minerais de selênio puros são muito raros. Desta maneira, berzelianita (Cu_2Se), tiemanita (HgSe) e naumanita (Ag_2Se) nunca são processados simplesmente para obter selênio. Entretanto, selênio ocorre em várias concentrações como elemento que acompanha muitos minérios de enxofre, embora a substituição isomórfica em piritas de cobre e ferro ou blenda de zinco não possa exceder um máximo teórico de 0,5% devido ao maior raio iônico do selênio (Se^{2-} : 0,191 nm, S^{2-} : 0,174 nm). A mais importante fonte de selênio são os concentrados da flotação de minérios de cobre que contém aproximadamente 100 - 400 g de selênio por tonelada de minério. Além da extração do selênio do minério de cobre, a reciclagem de tambores e retificadores de máquinas xerográficas tem se tornado uma importante fonte deste elemento.^(17,20)

A tabela 2 apresenta os usos do selênio e seus compostos divididos em categorias.

Tabela 2 – Categoria de usos do selênio e seus compostos.⁽¹⁷⁾

Categoria	Percentual
Aplicações eletrônicas	25 %
Pigmentos	10 %
Indústria de vidro	40 %
Metalurgia	10 %
Agricultura e aplicações biológicas	5 %
Outros usos (como por exemplo vulcanização da borracha, catalisador de oxidações, etc.)	10 %

Aplicações eletrônicas ⁽¹⁷⁾ → um retificador de selênio consiste em uma chapa de aço ou alumínio revestida com níquel, com uma fina camada (espessura de 50 – 60 μm) de selênio. O selênio conduz eletricidade preferencialmente em uma única direção e esta propriedade tem sido utilizada desde 1920 para converter corrente alternada em contínua. Uma liga de cádmio espalhada é usada como contra eletrodo. Vários desses retificadores podem ser empilhados em séries. A eficiência da retificação é aproximadamente de 85 %. Embora retificadores de selênio tenham sido progressivamente substituídos por diodos retificadores de germânio e silício, os primeiros ainda são usados onde a eficiência do retificador deva ser mantida em situações em que a voltagem oscile.

O uso de selênio na tecnologia de fotocópias está baseado na sua sensibilidade à luz. Selênio, que pode ser obtido com alta pureza, dopado ou como liga, é depositado por

vaporização para formar um filme de 50 µm de espessura, sobre um tambor de alumínio. No processo de fotocópia, a superfície de selênio é primeiramente carregada por uma descarga de alta voltagem. O tambor é então exposto à luz projetada sobre a figura. Onde a luz que atravessa a figura incide sobre o tambor, a carga sobre o selênio se esvai e uma figura “eletrizada” é portanto formada. Após o estágio de iluminação, um pó termoplástico (toner) é aplicado ao tambor sendo atraído eletrostaticamente para as partes carregadas (não iluminadas) e então fixadas pelo calor.

Pigmentos ⁽¹⁷⁾ → selênio é usado como pigmento na forma de sulfosseleneto de cádmio (cor vermelha intensa). Este é um importante pigmento para plásticos, pois além de ser termicamente estável não afeta significativamente suas propriedades físicas. Entretanto a importância desses pigmentos tem diminuído consideravelmente devido à toxicidade dos compostos de cádmio, chegando a ser proibida a sua utilização em certos países.

Manufatura do vidro ⁽¹⁷⁾ → selênio e seus compostos são utilizados em vidros de silicatos, tanto para descoloração, sua principal aplicação na manufatura de vidros, quanto para dar cores que podem variar desde o vermelho até o amarelo.

Metalurgia ⁽¹⁷⁾ → a adição de selênio ao aço melhora sua maleabilidade, resultando em altas velocidades de cortes, baixo consumo de energia e um tempo de vida mais longo para a ferramenta.

Agricultura ⁽¹⁷⁾ → como visto anteriormente, embora a toxicidade do solo com alto teor de selênio já seja conhecida há muito tempo, a sua necessidade como um elemento essencial só foi descoberto mais tarde. Dessa forma selênio é adicionado a fertilizantes ou à ração animal na forma de seleneto ou selenato de sódio que é absorvido mais facilmente pelas plantas.

Outros usos ⁽¹⁷⁾ → selênio e seus compostos são adicionados juntamente com enxofre para manufatura da borracha. Este melhora a estabilidade térmica do produto e controla a velocidade de vulcanização. Compostos de selênio são também usados em pequena extensão para a oxidação de hidrocarbonetos. Dióxido de selênio é também usado como agente oxidante seletivo em química orgânica. Conforme comentado anteriormente selênio atua também como absorvente de mercúrio e a adição de 5 % de selênio tem sido proposta para a preparação de amálgamas dentárias.

I.3) MÉTODOS CINÉTICOS DE ANÁLISE

I.3.1) INTRODUÇÃO

"Kinetics has been well recognized in most traditional subdisciplines of chemistry (physical, organic, and inorganic) but was neglected by analytical chemists, mostly because of the complete domination of teaching in that area by the equilibrium viewpoint of chemical reactions. However, developments in electroanalytical chemistry (e.g., polarography) and analytical spectroscopy (ultraviolet and visible absorption), for instance, provided the first sparks of change."⁽²¹⁾

Mottola, H. A.

Reações catalíticas têm desempenhado um importante papel na análise de elementos traço e, desta forma métodos cinéticos-catalíticos de análise vem progredindo muito nos últimos anos. A mudança de uma propriedade física tal como absorbância, fluorescência, quimiluminescência, ou o potencial de eletrodo em um sistema em função do tempo é normalmente monitorada para a obtenção de dados.⁽²¹⁾

Tais métodos diferem fundamentalmente dos métodos termodinâmicos porque suas medidas são feitas em condições dinâmicas ($v_{direta} > v_{inversa}$), antes que a reação entre em equilíbrio ($v_{direta} = v_{inversa}$), enquanto as concentrações dos reagentes e produtos estão variando continuamente (figura 5).^(21,22,23)

Medidas na região cinética são afetadas por uma variável normalmente de nenhuma consequência na região de equilíbrio: o tempo. Esta característica dos métodos cinéticos permite a utilização analítica de um número maior de reações químicas, pois são adequados para reações muito lentas ou que não se completam quantitativamente e, portanto, seriam problemáticas para os métodos termodinâmicos. Além disso, destacam-se também os aspectos extremamente favoráveis que tornam muito atraente a utilização dos métodos cinéticos de análise: são de baixo custo e não envolvem sofisticação instrumental. Essas

características justificam o interesse no desenvolvimento da metodologia cinética de análise.

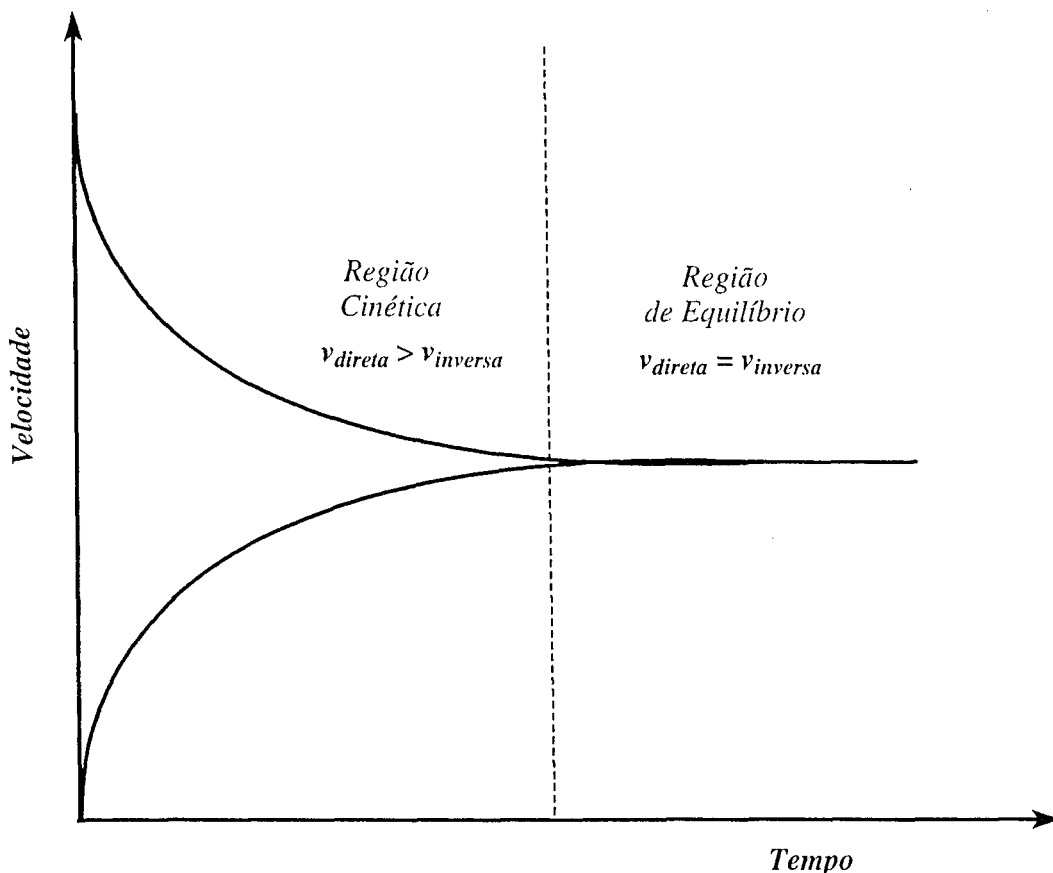


Figura 5 - Variação da velocidade das reações direta e inversa de uma reação química apresentando duas regiões distintas, sendo uma caracterizada por região dinâmica (cinética) e a outra por região termodinâmica (equilíbrio).

Um aspecto que pode ser problemático na metodologia cinética de análise é a reprodutibilidade dos resultados que requer o controle das condições que afetam a velocidade das reações, como: temperatura, pH, força iônica, solventes e o processo de adição, mistura de reagentes e tempo. Por exemplo, as reações que devem ser realizadas sob termostatização e a adição e a mistura de reagentes devem ser feitas com critério, sendo necessário o uso de dispositivos especiais como: sistema de injeção manual simultânea de reagentes, ou sistema de mistura de fluxo interrompido (*Stopped Flow*), ou sistemas com fluxo, que representam opções úteis em casos específicos, de acordo com a velocidade em que a reação estudada ocorre.⁽²⁴⁾

De acordo com o tipo de reação envolvida, os métodos cinéticos de análise podem ser classificados como apresentado na figura 6.

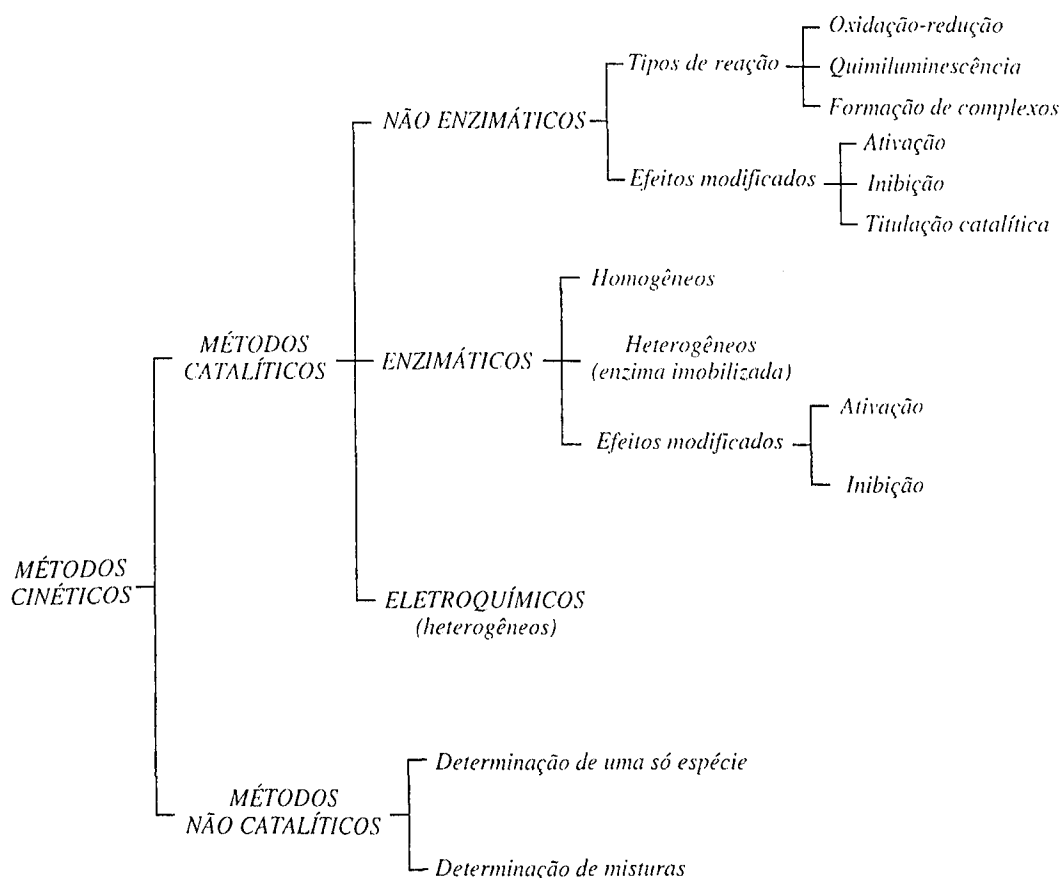


Figura 6 - Classificação dos métodos cinéticos de análise.⁽²⁴⁾

De acordo com essa classificação, o método utilizado no presente trabalho é um método catalítico não-enzimático com reação de óxido-redução.

I.3.2) BASES MATEMÁTICAS DE MÉTODOS CATALÍTICOS⁽²¹⁾

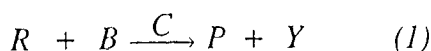
Antes de se discutir métodos catalíticos em detalhes, o termo catalisador deve ser definido sem ambigüidade. Isto é necessário porque a categoria “métodos catalíticos” denota todas as determinações químicas baseadas no monitoramento da velocidade de uma reação catalisada. O critério para catálise assim como o seu próprio nome (catálise vem do grego, significando “soltar”) foi proposto por J. J. Berzelius por volta de 1835-1836. A definição de Berzelius indica que (a) o catalisador é uma espécie quimicamente invariável ao final de uma reação; (b) uma pequena quantidade de catalisador é às vezes suficiente para conduzir uma considerável quantidade de reações; e (c) o catalisador não afeta a posição do equilíbrio em

uma reação reversível. Esses conceitos levam à definição de um catalisador como sendo uma substância que diminui a energia livre de ativação. A diminuição da energia livre de ativação ocorre através de um mecanismo no qual o catalisador é constantemente regenerado (o ciclo catalítico) de modo que para todos os propósitos práticos a concentração do catalisador permanece constante. Um catalisador pode apenas aumentar a velocidade de reação, e desta maneira o uso de termos como *catalisador negativo* para substâncias que aumentam a energia livre de ativação devem ser abandonadas.

Deve ser ressaltado aqui que um catalisador influencia tanto a velocidade da reação direta como da inversa. Dessa forma, as poucas últimas palavras não são essenciais, pois aumentar a velocidade de um processo não espontâneo não é interesse de nenhum analista. O papel conceitual chave para utilização da catálise por um analista está concentrada no ciclo catalítico.

Dois fatos devem ser considerados para desenvolver relações válidas para determinações catalíticas: (a) a reação não catalisada procede simultaneamente com a reação catalisada, e (b) a velocidade da reação catalisada é diretamente ou quase proporcional à concentração do catalisador como resultado do ciclo catalítico. Na maioria dos casos de interesse prático em química analítica, o primeiro fato é de pequena significância devido à reação catalisada ser muito mais rápida do que aquela não catalisada. O segundo fato é, no entanto a base de muitos métodos catalíticos.

Antes de se entrar em formulações, deve-se ressaltar que a direta ou quase direta relação entre a concentração do catalisador e a velocidade da reação catalisada é melhor obedecida se certas condições são satisfeitas, como manter em nível constante todas as variáveis que normalmente afetam a velocidade de reações químicas (como por exemplo temperatura, força iônica e solvente usado). Outro importante requerimento de ordem prática para aplicações bem sucedidas de determinações convencionais baseadas em efeitos catalíticos é que as concentrações dos reagentes, exceto o catalisador e as espécies cuja variação de concentração é monitorada, deve ser tal que faça seu efeito sobre a velocidade ser de pseudo-zero ordem. As espécies cuja mudança na concentração está sendo monitorada são ajustadas à dependência de primeira ordem. Quando todos esses fatos e requerimentos são considerados e satisfeitos, tem-se para uma situação geral que:⁽²¹⁾

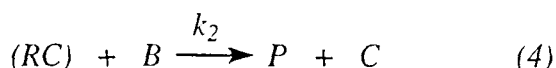
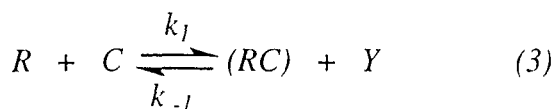


onde R e B são reagentes (R = espécie monitorada), P e Y são produtos e C é o catalisador. Para a reação anterior pode ser escrita a seguinte expressão geral:

$$-\frac{d[R]}{dt} = k_u [R] + k_c [R][C]_o = [R](k_u + k_c [C]_o) \quad (2)$$

em que k_u = constante de velocidade para reação não catalisada (mais alguns termos de concentração), k_c = constante de velocidade para reação catalisada (mais alguns termos de concentração), e $[C]_o$ = concentração inicial do catalisador no sistema.

Dirigindo a atenção ao termo que caracteriza a reação catalisada em (2) e considerando a presença de um ciclo catalítico, pode se usar uma reação simplificada em duas etapas, (3) e (4), para desenvolver as relações matemáticas das condições limite que explicam a direta ou quase direta relação entre a velocidade da reação catalisada e a concentração do catalisador:



O mecanismo simplificado para o ciclo catalítico leva a duas condições limite: (a) um caso de pré-equilíbrio, e (b) uma situação de estado estacionário, o qual depende dos valores relativos das correspondentes constantes de velocidade para as reações representadas pelas equações (3) e (4). As relações matemáticas procuradas dependem dos valores de concentração da espécie intermediária (RC) para ser substituída nas expressões de velocidade na etapa determinante desta.

Se $k_{-1} \ll k_1$ e $k_2 \ll k_1$, a reação representada por (4) torna-se a etapa determinante da velocidade da reação e tem-se um condição de pré-equilíbrio. Sob essas condições a concentração de equilíbrio da espécie (RC) pode ser obtida pelo

quociente de equilíbrio K em função das concentrações das espécies presentes na reação (3).

$$[(RC)] = \frac{K[C][R]}{[Y]} \quad (5)$$

onde $K = k_{-1}/k_1$ = quociente de equilíbrio em termos da concentração, para a reação (3). Definindo $[C]_0$ e $[R]_0$ como concentrações de equilíbrio no tempo $t=0$, tem-se que em qualquer tempo t,

$$[R] = [R]_0 - [(RC)] \quad (6)$$

e

$$[C] = [C]_0 - [(RC)] \quad (7)$$

Em métodos catalíticos $[R]_0 \gg [C]_0$; (o catalisador é determinado em níveis muito baixos de concentração, ou seja, níveis subestequiométricos de concentração). Portanto, [R] pode ser considerada ser igual a $[R]_0$ e daí a partir da equação (5) tem-se:

$$[(RC)] = \frac{K\{[C]_0 - [(RC)]\}[R]_0}{[Y]} \quad (8)$$

que expandida e rearranjada, torna-se

$$[(RC)] (K [R]_0 + [Y]) = K [C]_0 [R]_0 \quad (9)$$

da qual uma expressão para $[(RC)]$ pode ser obtida:

$$[(RC)] = \frac{K [C]_0 [R]_0}{K [R]_0 + [Y]} \quad (10)$$

Na condição de pré-equilíbrio, a reação (4) é a etapa limitante da velocidade e conseqüentemente,

$$v = k_2 [(RC)] [B] \quad (11)$$

ou ainda

$$v = k_2 [B] \frac{K[C]_0[R]_0}{K[R]_0 + [Y]} \quad (12)$$

Se as medidas forem realizadas sob condições para as quais $[Y] \ll K [R]_0$ (facilmente satisfeita em sistemas catalíticos pelo fato de Y não ser formado absolutamente, ou visto que a quantidade do catalisador é muito baixa sua concentração é praticamente desprezível), e $[B]$ sendo constante (por exemplo no estágio inicial da reação), então da equação (12) segue que:

$$v = - \frac{d[R]}{dt} = k_2' [C]_0 \quad (13)$$

onde $k_2' = k_2 [B]$

A relação encontrada em (13) reflete a proporcionalidade entre a concentração do catalisador e a velocidade da reação quando usada para determinações analíticas.⁽²¹⁾

Uma outra maneira de obter esta relação é assumir que $k_2 \gg k_1 \gg k_{-1}$ e, assim a reação (3) torna-se a etapa limitante da velocidade da reação e, $[(RC)]$ é pequena devido à quantidade de catalisador também ser muito baixa e nestas circunstâncias a aproximação do estado estacionário estabelece que:

$$\frac{d[(RC)]}{dt} = 0 \quad (14)$$

A expressão da velocidade torna-se:

$$- \frac{d[R]}{dt} = k_1 [R][C] - k_{-1} [(RC)][Y] \quad (15)$$

Visto que $[(RC)]$ não pode ser medida experimentalmente, deve-se recorrer à aproximação do estado estacionário para obter uma expressão para esta espécie:

$$\frac{d[(RC)]}{dt} = 0 = k_1 [R][C] - k_{-1} [(RC)][Y] - k_2 [(RC)][B] \quad (16)$$

Aqui pode se substituir $[R]_0 - [(RC)]$ e $[C]_0 - [(RC)]$ por $[R]$ e $[C]$, respectivamente. Expandindo, simplificando e rearranjando a expressão (16) tem-se:

$$[(RC)] = \frac{k_1 [R]_0 [C]_0}{k_1 ([R]_0 + [C]_0) + k_{-1} [Y] + k_2 [B]} \quad (17)$$

e reescrevendo a equação (15) tem-se:

$$-\frac{d[R]}{dt} = k_1 [R]_0 [C]_0 - k_1 [(RC)]([R]_0 + [C]_0) - k_{-1} [(RC)][Y] \quad (18)$$

e substituindo $[(RC)]$ na equação na equação (18) por sua expressão na equação (17), expandindo e simplificando, obtém-se:

$$-\frac{d[R]}{dt} = \frac{k_1 k_2 [B][R]_0 [C]_0}{k_1 ([R]_0 + [C]_0) + k_{-1} [Y] + k_2 [B]} \quad (19)$$

Visto que $[C]_0 \ll [R]_0$ e $k_1 [R]_0 \gg k_{-1} [Y]$, e sendo, como visto anteriormente que $[B] = \text{constante}$, segue que:

$$-\frac{d[R]}{dt} = v = k_2' [C]_0 \quad (20)$$

onde

$$k_2' = \frac{k_1 k_2 [B][R]_0}{k_1 [R]_0 + k_2 [B]}$$

A equação (20) demonstra novamente a relação direta entre catalisador e velocidade de reação.

Se apropriadamente consideradas ambas aproximações – tanto para o pré-equilíbrio quanto para o estado estacionário – apresentam diferentes extensões de aplicabilidade com uma região comum. A inter-relação entre as duas aproximações tem sido tratada em detalhes por Pyun.⁽²¹⁾

I.4) ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO MONOSSEGMENTADO (AFCM)

O primeiro sistema de análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM) foi proposto por Pasquini e Oliveira para a determinação espectrofotométrica de cromo, amônia e fósforo.⁽²⁵⁾ Tal sistema possui como principal característica a inserção da amostra entre duas bolhas, formando um monossegmento. O esquema da figura 7 representa o referido sistema.

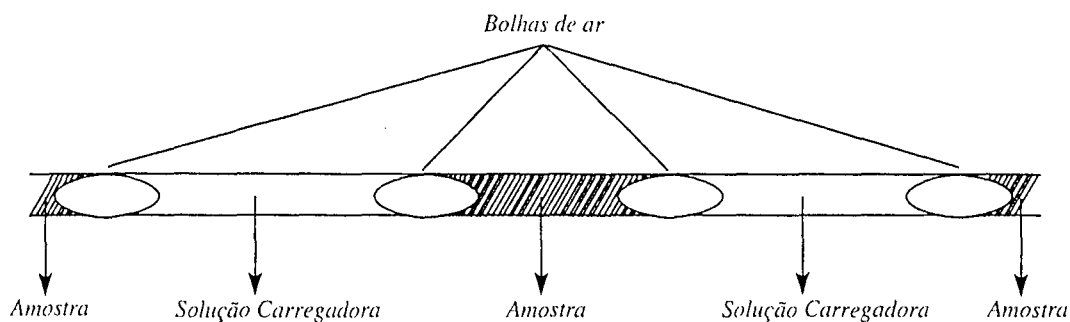


Figura 7 - Sistema monossegmentado. A amostra está entre duas bolhas de ar e ao lado destas encontra-se a solução carregadora.

Esta segmentação tem a função de diminuir significativamente a dispersão em tempos de residência maiores, pois mantém a integridade da amostra. Estas características tornam-se muito importantes em reações que possuem cinética lenta, e não necessariamente comprometem a frequência de amostragem, pois as amostras podem ser inseridas sequencialmente e, após decorrido o tempo de reação e detecção para a primeira amostra, todas as outras virão na sequência. Em comparação à análise em fluxo contínuo segmentado, introduzida por Skeggs, o

sistema em AFCM possui uma maior simplicidade, um menor consumo de amostra e reagentes e maior frequência analítica.⁽²⁶⁾ Em relação à análise por injeção em fluxo (FIA), proposta por Ruzicka e Hansen,⁽²⁷⁾ sua principal vantagem é a possibilidade de utilizar tempos de residência maiores. A figura 8 apresenta um diagrama esquemático de um sistema AFCM típico.⁽²⁸⁾

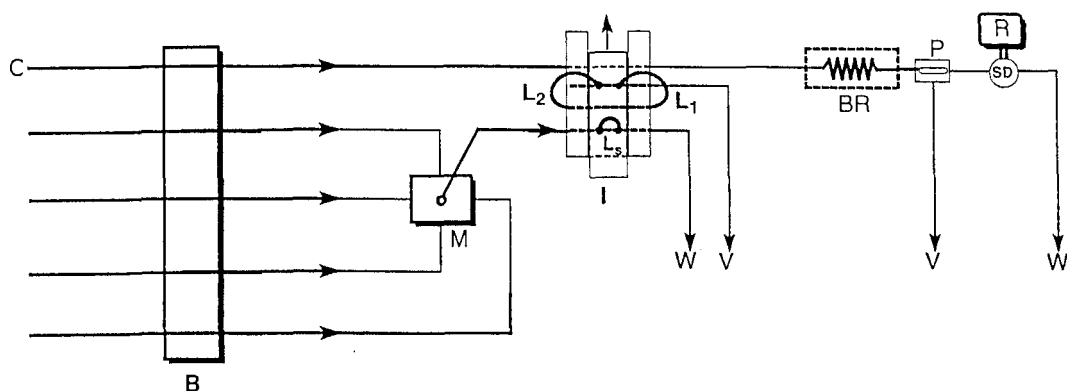


Figura 8 - Configuração do sistema AFCM.⁽²⁸⁾

B – Bomba peristáltica; **C** – fluido carregador; **M** – Câmara de mistura; **I** – Injetor; **L₁** e **L₂** – alças para a introdução de bolhas; **L_s** – alça de amostragem; **W** – frasco de resíduo; **V** – vácuo; **BR** – Bobina de reação; **P** – cela de permeação; **SD** – sistema de detecção; **R** – Registrador.

A introdução da amostra no sistema é feita através de um injetor construído em acrílico,⁽²⁹⁾ **I**, sendo que este pode ser comutado. O fluido carregador, **C**, empurra o ar, contido na alça **L₂**, que por sua vez empurra a amostra (contida em **L_s**), cujo volume é determinado pelo tamanho da alça de amostragem, **L_s**, e esta empurra o ar presente na outra alça **L₁**. Deste modo, a amostra fica entre as duas bolhas, que a mantém isolada do fluido carregador. Os fluídos são bombeados/aspirados por uma bomba peristáltica, **B**, e a reação ocorre na bobina reacional, **BR**. As bolhas podem ser retiradas de várias maneiras, tais como a utilização de cela de permeação **P** ou aspiração diferenciada,⁽²⁶⁾ antes da detecção, **SD** e registrador, **R**. Em seguida a amostra vai para o descarte, **W**.

Novas amostras podem ser inseridas, bastando para isso a comutação do injetor para a posição de amostragem. Esta possibilidade de inserir várias

amostras (ou uma amostra várias vezes) torna a AFCM uma técnica com alta frequência analítica (até 120 injeções/hora).⁽²⁵⁾

Uma outra vantagem da AFCM é a possibilidade de localização do monossegmento no sistema, visualmente e/ou através de chaves ópticas, sensíveis à mudança do índice de refração (fluido carregador/bolha/amostra), no caso de sistemas automáticos, permitindo a adição de reagentes em qualquer posição do monossegmento ou a definição do momento em que será realizada a detecção.⁽²⁶⁾

Devido a estas vantagens, a AFCM vem sendo utilizada para as mais diversas aplicações analíticas, tais como titulações automáticas⁽³⁰⁾ e extração líquido-líquido.^(31,32) Por possibilitar tempos de residência mais longos, também têm sido realizados trabalhos com reações enzimáticas^(33,34) reações catalíticas^(35,36) e outros tipos de reações que apresentam cinética lenta.^(26,37)

1.5) SISTEMA REACIONAL

O presente trabalho fundamenta-se no método colorimétrico desenvolvido por Dechary et al.⁽³⁸⁾ para a determinação de glioxal (etanodial). Este se baseia na reação da 2,3-diaminofenazina (DAP) com glioxal para formar 1,4,6,11-tetraazanaftaceno (TAN) e posterior redução deste último pelo ácido hipofosforoso (H_3PO_2) a 1,6-dihidro-1,4,6,11-tetraazanaftaceno (DHTAN).^{**} A figura 9 apresenta as reações envolvidas nesta determinação.^(39,40)

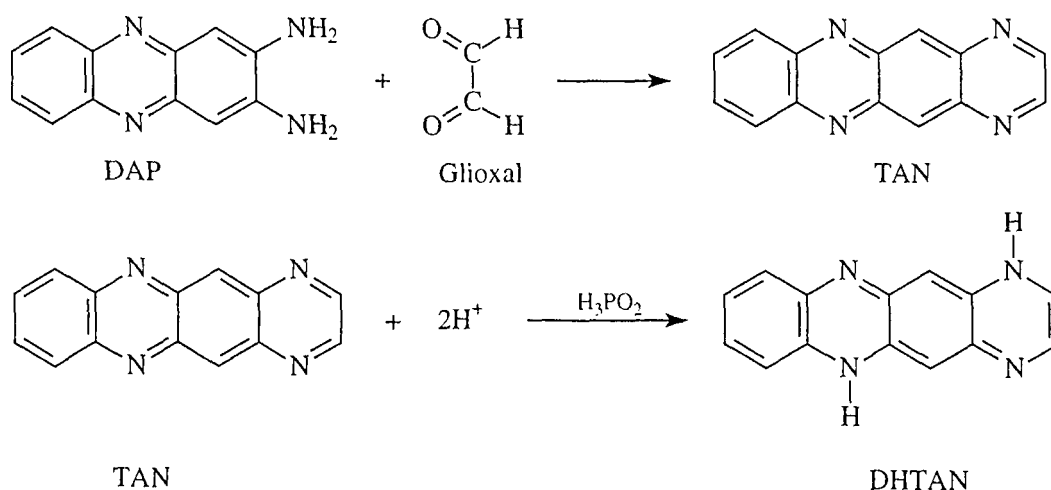


Figura 9 - Esquema de reações envolvidas na determinação de glioxal.

^{**} A partir deste ponto, serão usadas as abreviações entre parênteses ao se fazer referência aos compostos 2,3-diaminofenazina, 1,4,6,11-tetraazanaftaceno e 1,6-dihidro-1,4,6,11-tetraazanaftaceno.

Em 1964, Tanaka, Kawashima e Miwa⁽³⁹⁾ encontraram que o selênio(IV) apresentava efeito catalítico sobre a redução do TAN a DHTAN pelo ácido hipofosforoso (H_3PO_2), propondo-se assim a utilização dessas reações para a determinação catalítica de selênio(IV) em águas de rios e mares, com alta sensibilidade. A figura 10 apresenta a etapa do conjunto de reações que é catalisada pelos íons selênio(IV).

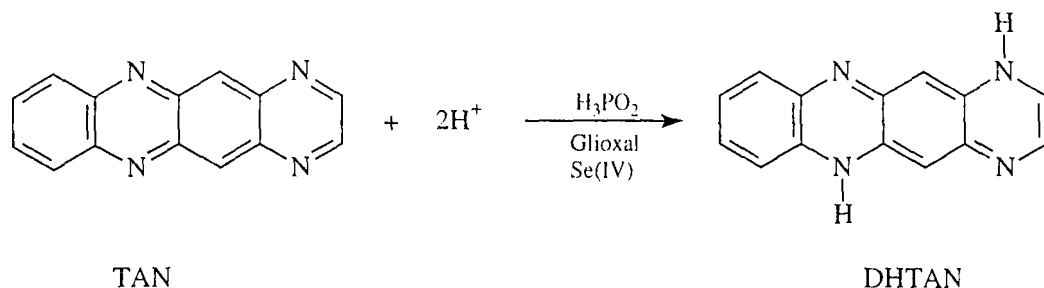


Figura 10 - Esquema da etapa catalisada por selênio(IV) a qual viabiliza a sua determinação catalítica.

A redução anterior é catalisada por uma quantidade diminuta de Se(IV) e a reação é de primeira ordem em relação ao DAP, ao ácido hipofosforoso e Se(IV). Na ausência de selênio, a reação é de primeira ordem com relação ao glioxal, enquanto na presença de selênio a dependência da reação para com o glioxal sofre ligeira alteração conforme pode ser evidenciado pela equação de velocidade a seguir:⁽⁴¹⁾

$$\frac{d[\text{DHTAN}]}{dt} = \left\{ k_1 [\text{glioxal}] + k_2 [\text{C}_{\text{Se}}] [\text{glioxal}]^{\frac{2}{3}} \right\} [\text{DAP}] [\text{H}_3\text{PO}_2]$$

O papel do glioxal parece ser diferente na ausência e na presença de selênio. Um produto ainda não identificado da reação do glioxal com o ácido hipofosforoso reduz o TAN a DHTAN, e Se(IV) atua então como catalisador.

O presente trabalho visou a viabilização da determinação de Se(IV) em amostras de cabelo, utilizando um sistema de análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM). Além disso, foram considerados também no estudo, os aspectos que podem ser avaliados em um método cinético de análise, visando

um aumento de velocidade da reação, tais como, concentração dos reagentes, concentração hidrogeniônica do meio reacional e utilização de ativadores. Nestas avaliações sempre que pertinentes foram empregadas técnicas quimiométricas de otimização.

1.6) CABELO COMO MATRIZ PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO

Interesse em cabelo humano como amostra clínica tem aumentado nos últimos anos devido a uma série de vantagens oferecidas por este tipo de matriz sobre outras matrizes de interesse, tais como sangue e urina.^(42,43) Em termos de complexidade, o cabelo é uma matriz mais simples que o sangue e a urina, cuja análise é bastante utilizada para verificar uma possível intoxicação, ou diagnosticar doenças. Além disso, a análise do cabelo é ainda mais fácil porque a maioria dos elementos traço está presente em concentração mais alta do que no sangue e urina. O cabelo é um material biológico atrativo por causa da simplicidade de amostragem (facilidade de coleta, sem traumas e indolor), estocagem, transporte e manuseio.⁽⁴⁴⁾ Além disso, é um material bastante estável não precisando ser mantido sob refrigeração, nem mesmo necessita de preservantes. Isto, por exemplo, facilita a avaliação de uma população inteira de determinado local que está sendo contaminada através da água ou poluentes industriais.^(42,44)

Espécies químicas são incorporadas pelo cabelo através de diferentes fontes e mecanismos endógenos e exógenos. As fontes endógenas são as mais importantes quando se deseja fazer uma avaliação do estado de saúde de um indivíduo, no que diz respeito a anomalias fisiológicas, desequilíbrio nutricional ou intoxicação ambiental. Muito embora as fontes exógenas contribuam, também, para a concentração total de elementos no cabelo, etapas de lavagem devem ser realizadas com a finalidade de minimizar problemas na interpretação biomédica dos resultados.⁽⁴⁵⁾

Existem ainda muitas controvérsias na utilização de cabelo para a determinação de elementos traço no cabelo humano, porém esta técnica é importante nas ciências biológicas, médicas, criminais e ambientais. Ele é muito

útil para avaliar o consumo e metabolismo de drogas na área médica e criminal, onde até hoje é dada maior credibilidade aos resultados da análise do cabelo.⁽⁴⁴⁾

Historicamente a primeira análise de cabelo foi publicada por Hoppe em 1858, que determinou As no cabelo de cadáveres exumados 11 anos após o sepultamento. Uma outra aplicação da análise de cabelo humano foi na investigação sobre a morte de Napoleão Bonaparte em que, através da análise do seu cabelo por NAA (Análise por Ativação de Nêutrons), foram verificadas sucessivas exposições ao As. Observou-se a presença de As no cabelo de Napoleão Bonaparte ao se analisar diferentes partes do mesmo fio de cabelo. A partir desta análise conclui-se que o As ligou-se irreversivelmente com as proteínas do cabelo, cujo crescimento diário do folículo foi 0,35 mm, fazendo com que a distribuição do elemento ocorresse de forma segmentada. Assim, as diferentes exposições de Napoleão Bonaparte ao As puderam ser registradas através do cabelo. Com base em tais resultados, o cabelo foi também utilizado para comprovar a contaminação por Hg na população de um vilarejo do Iraque, onde o trigo utilizado para o pão era tratado com fungicida à base de compostos mercuriais.⁽⁴⁴⁾

Em 1945, foi proposto o uso do cabelo como material de biópsia na determinação de elementos traço presentes no corpo humano, uma vez que o cabelo funciona como um órgão excretor (o menor deles). Nas décadas seguintes foi dada preferência às análises de sangue e urina, sendo que na década de 1930 iniciou-se a era da medicina industrial, ou seja, o diagnóstico de doenças a partir de exames laboratoriais. Nos anos 60, redescobriu-se a utilidade da análise de cabelo na área de nutrição, e na década seguinte foram realizados vários simpósios a respeito do assunto e além da publicação de vários livros.⁽⁴⁴⁾

Em virtude do que foi exposto anteriormente, escolheu-se o cabelo humano como matriz para aplicação do referido método.

II) OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi viabilizar a determinação de Se(IV) em um sistema de análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM) com posterior determinação espectrofotométrica, tomando-se como referência o método proposto por Tanaka, Kawashima e Miwa.⁽³⁹⁾

Aplicar técnicas quimiométricas de otimização visando diminuir o limite de detecção e aumentar sensibilidade da metodologia.

Além disso, foi também objetivo deste trabalho avaliar a aplicabilidade do método resultante na determinação de selênio em cabelo humano.

III) PARTE EXPERIMENTAL

III.1) INSTRUMENTAÇÃO

A figura 11 representa a configuração básica de AFCM⁽²⁸⁾ utilizada para a realização dos experimentos de determinação de Se(IV).

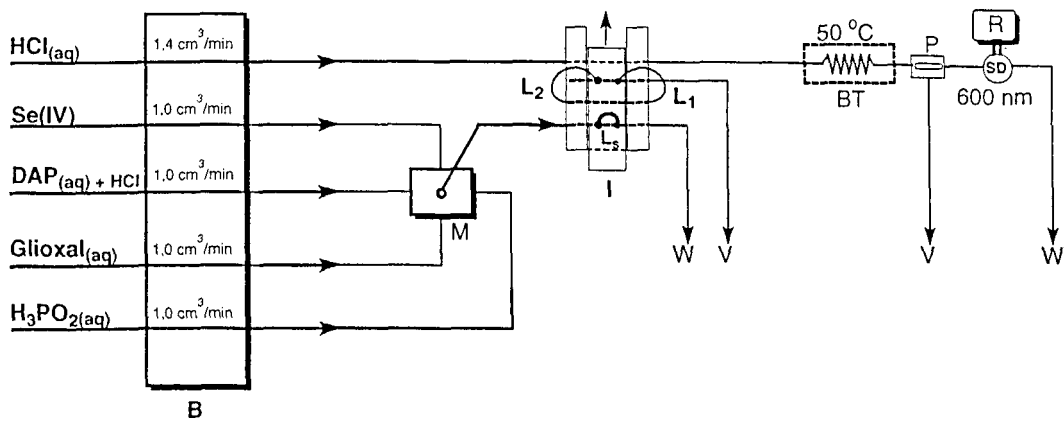


Figura 11 - Configuração do sistema AFCM usado para a determinação espectrofotométrica de selênio.

B – Bomba peristáltica; M – Câmara de mistura; I – Injetor; L_1 e L_2 – alças para a introdução de bolhas; L_s – alça de amostragem; W – frasco de resíduo; V – vácuo; BT – Banho termostatzado para acomodação da bobina de reação; P – cela de permeação; SD – sistema de detecção; R – Registrador.

Neste sistema, a solução carregadora e os reagentes foram impulsionados por uma bomba peristáltica Gilson Miniplus 3; numa vazão de 1,4 cm³/min para o carregador e 1,0 cm³/min para os reagentes, utilizando-se cabos de propulsão Tygon[®]. Estes reagentes são misturados em uma câmara M, a qual é representada em detalhes na figura 12. Nesta câmara de mistura introduz-se uma pequena barra magnética para que, em conjunto com um agitador magnético, a mistura possa ocorrer de forma mais rápida e homogênea. Este modo de mistura de reagentes é interessante em sistemas de otimização quimiométrica, uma vez que as concentrações das espécies envolvidas podem ser alteradas com facilidade em estudos multivariados.

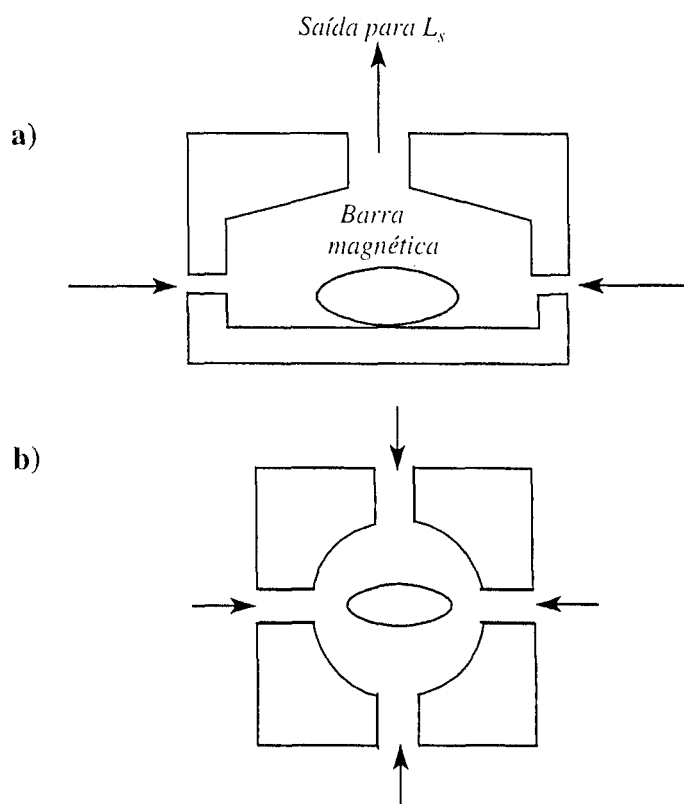


Figura 12 - Câmara de mistura com barra magnética em seu interior.

a) Corte transversal; b) Vista superior.

O injetor de acrílico **I** é dotado de uma alavanca que permite o carregamento e descarregamento da alça de amostragem.

Tubos de polietileno ($\varnothing = 0,8 \text{ mm}$) foram utilizados para alças de amostragem e linhas de carregamento. Um tubo denominado comercialmente de “mangueira cristal” ($\varnothing = 3,0 \text{ mm}$ e 10 m de comprimento) foi empregado como bobina de reação. A temperatura da bobina de reação foi mantida em $50 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, através de um banho ultratermostatizado Marconi (MOD. MA 184), enquanto que as outras partes do sistema de AFCM se mantiveram à uma temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ através de aparelhos condicionadores de ar.

A figura 13 representa a cela de permeação que foi utilizada para a retirada das bolhas de ar entre as amostras, antes da detecção do sinal analítico. Ela consiste basicamente de duas partes (A e B) feitas de acrílico e mantidas juntas por quatro parafusos. Na junção das duas partes coloca-se uma membrana de Teflon[®], comercializada pelo nome de “veda rosca”, para que as bolhas de ar possam permear por ela enquanto a solução continua normalmente o percurso. A

retirada das bolhas de ar por permeação é auxiliada pela utilização de vácuo conforme representado na figura.

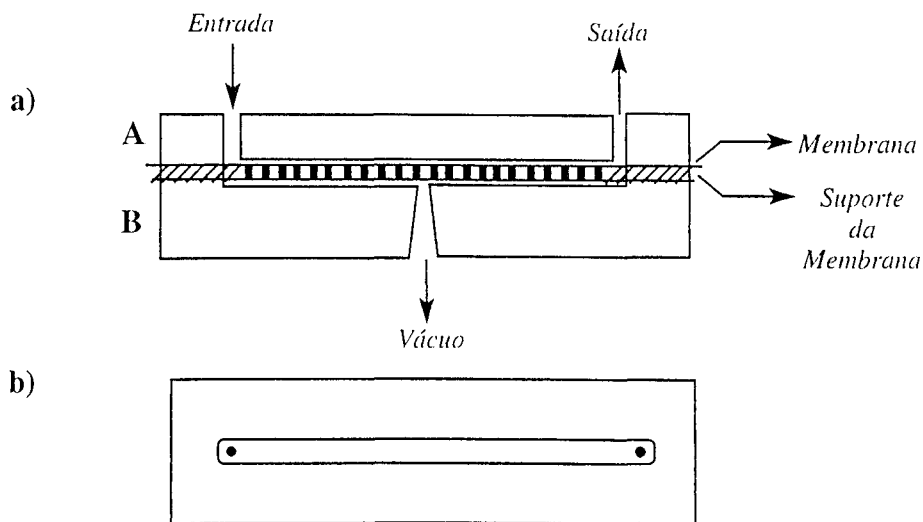


Figura 13 - Cella de permeação para retirada de bolhas.

a) Corte transversal; b) Vista superior.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Metertek SP-850 de feixe simples operando em 600 nm, com uma cela de fluxo de quartzo, com um volume de 80 μL . Os sinais analíticos foram obtidos em transmitância (T) e registrados em um aparelho Kipp & Zonen (MOD. BD 11E) sendo, estes sinais, posteriormente convertidos em absorbância.

Neste trabalho, todas as soluções utilizadas foram preparadas empregando-se água deionizada obtida em um sistema de purificação Milli-Q_{PLUS}, permitindo se obter água de elevada pureza ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

As soluções de trabalho de glioxal foram preparadas diariamente pela diluição de um volume adequado de glioxal concentrado (Vetec) 40%, $d = 1,27 \text{ g/cm}^3$ em água, enquanto as soluções de ácido hipofosforoso foram preparadas pela diluição de volumes adequados de H_3PO_2 (Synth) 50%.

As soluções de trabalho de DAP foram preparadas diariamente a partir de dissolução de cloridrato de DAP (283,15 g/mol), obtido e purificado de acordo com procedimento proposto por Jang, Yoo e Oh⁽⁴⁶⁾ ou aquele proposto por Euler e

Premasiri.⁽⁴⁷⁾ O Apêndice 1 descreve detalhadamente os processos de síntese e purificação do cloridrato de DAP a partir da 1,2-diaminobenzeno (o-PD)(Aldrich Chemical Company).

Uma solução estoque de Se(IV) 1000 µg/mL foi preparada pela diluição de um padrão Merck contendo 1000 mg de Se(IV) para 1 L de solução. Todas as outras soluções de selênio foram preparadas diariamente a partir de diluições adequadas dessa solução estoque.

Neste trabalho foi utilizado também, ácido perclórico concentrado (HClO₄: Merck, d = 1,69 g/cm³ e τ = 72%), ácido clorídrico concentrado (HCl: Merck, d = 1,19 g/cm³ e τ = 37%), ácido nítrico concentrado (HNO₃: Merck, d = 1,42 g/cm³ τ = 69,3%).

As soluções utilizadas no tratamento e eliminação dos interferentes foram preparadas conforme descrito no Apêndice 2. Neste apêndice encontra-se os procedimentos para preparação de outras soluções e purificação de substâncias.

III.2) COLETA E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

III.2.1) COLETA

A coleta de amostras foi feita conforme recomendado por Carneiro et al..⁽⁴⁵⁾ Amostras de cabelo de todos os indivíduos participantes foram coletadas com uma tesoura de aço inoxidável de boa qualidade. Cerca de 1,0 g de amostra foi retirada da região occipital, logo acima da nuca. As amostras foram armazenadas em frascos adequados para tratamento posterior.

III.2.2) LAVAGEM DA AMOSTRA

O método de lavagem do cabelo é importante, pois é nesta etapa que se retira as partículas de poeira, suor, gordura, etc., evitando-se assim fontes exógenas de contaminação. O procedimento aqui adotado foi aquele recomendado pelo IAEA (International Atomic Energy Agency). Este método consiste em lavar a massa de cabelo sucessivamente: 1 vez com acetona, 3 vezes com água e 1 vez

com acetona; em cada lavagem o cabelo permanece todo o tempo recoberto com solvente, à temperatura ambiente e sob agitação. O líquido é decantado entre cada lavagem. Após a etapa de lavagem, deixou-se o cabelo secar a noite, envolvido em um papel de filtro de grau cromatográfico (Whatman) sendo posteriormente transferido para um dessecador.⁽⁴⁴⁾

III.2.3) SOLUBILIZAÇÃO DA AMOSTRA

Na decomposição das amostras de cabelo adotou-se o procedimento testado e recomendado por Huang et al..⁽⁴⁸⁾ Este procedimento faz uso de soluções concentradas de $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ na proporção de 8:1. Pesou-se previamente uma amostra de cabelo de 200 mg a qual foi transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL. A seguir adicionou-se 0,80 mL de HNO_3 e 0,10 mL de HClO_4 concentrados e o sistema foi deixado em repouso por 12 horas em local seguro de possíveis contaminações externas. Decorrido 12 horas o balão foi colocado em uma manta de aquecimento a uma temperatura de 160 °C. Esta temperatura foi mantida até que se visualizasse a evolução de uma nuvem branca característica de HClO_4 . A partir daí a temperatura foi diminuída e a solução amarelo-pálida resultante evaporada próximo à secura (*tomando sempre o cuidado de não deixar secar, evitando assim possíveis explosões!*). Após resfriamento do sistema o resíduo foi dissolvido com 1,0 mL de água deionizada e o pH então ajustado a 2 com NaOH 1 mol/L. Em seguida, foi adicionado peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% gota a gota até descoloração da solução. Posteriormente a solução foi levemente aquecida para eliminação do excesso de H_2O_2 .

III.2.4) REDUÇÃO DE Se(VI) PARA Se(IV) COM HCl

Após eliminação do H_2O_2 na etapa anterior, adicionou-se 1 mL de HCl concentrado e 1 mL de água deionizada. Em seguida o sistema foi cuidadosamente fervido por aproximadamente 10 minutos.⁽⁴⁹⁾ Após os 10 minutos a solução resultante foi resfriada e o seu pH elevado a 10.

III.2.5) TRATAMENTO DOS INTERFERENTES⁽⁵⁰⁾

À solução resultante do item anterior adicionou-se 1,00 mL de solução alcalina ($\text{pH} = 10$) de dietilditiocarbamato de sódio (NaDDC) 0,1 %. Em seguida fez-se uma extração com 10 mL de CCl_4 com agitação durante 1 minuto. A fase aquosa foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 25,0 mL juntamente com 0,2231 g de KBr e 0,1500 g de tartarato de sódio e potássio. Completou-se o balão até a marca e procedeu-se à análise do conteúdo de Se(IV) no sistema de AFCM.

IV) RESULTADOS E DISCUSSÃO

“Não sei de que modo o mundo me vê; mas a mim mesmo pareço ter sido apenas um menino brincando na praia, entretendo-me com encontrar de quando em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bela do que o ordinário enquanto todo o vasto oceano da verdade jazia inexplorado diante de mim.”

Isaac Newton

IV.1) ESPECTROS DE ABSORÇÃO

Como citado anteriormente o presente estudo tem como referência os resultados do trabalho realizado por Tanaka, Kawashima e Miwa.⁽³⁹⁾ Sendo assim, a primeira etapa foi a obtenção dos espectros de absorção do DAP, TAN e DHTAN, apresentados na figura 14.

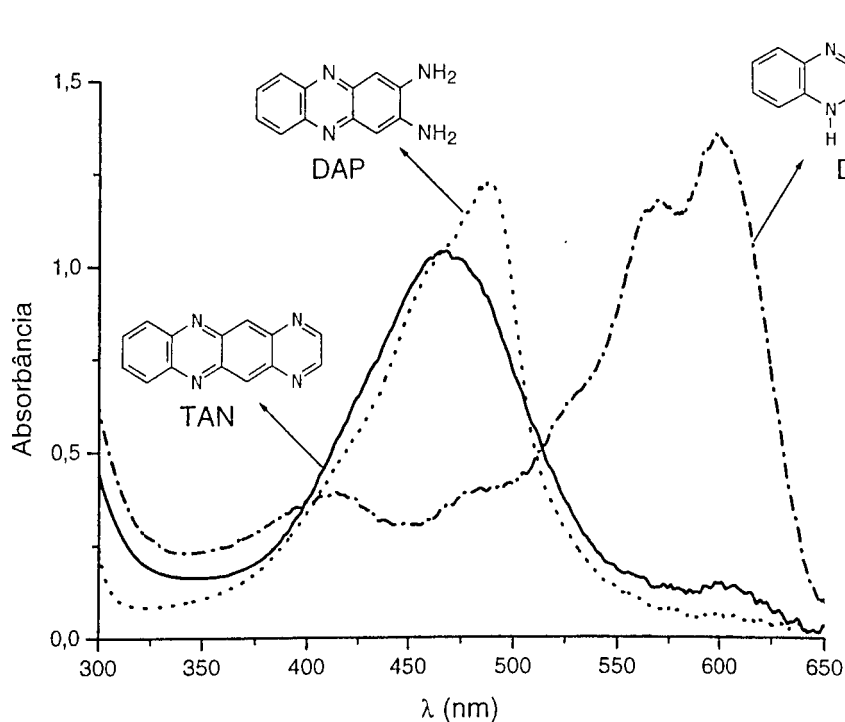


Figura 14 - Espectros de absorção para o DAP, TAN e DHTAN.

Para a obtenção dos espectros seguiu-se o procedimento recomendado por Kawashima e Tanaka.⁽⁴⁰⁾

Como se pode observar nos espectros da figura 14 o DHTAN ($\lambda_{\text{máx}} = 600$ nm, $\epsilon = 1,46 \times 10^6$) apresenta um máximo de absorção em uma região diferente daquela do TAN ($\lambda_{\text{máx}} = 478$ nm) e o DAP ($\lambda_{\text{máx}} = 492$ nm). Este resultado mostra evidências de que o método possui um branco de reagentes com baixo valor de absorbância.

IV.2) AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO SINAL COM O TEMPO

No intuito de se estabelecer um tempo adequado para a execução da reação, procedeu-se ao estudo da variação do sinal em função do tempo para o sistema na presença e ausência do catalisador, nas condições estabelecidas por Kawashima e Tanaka.⁽⁴⁰⁾

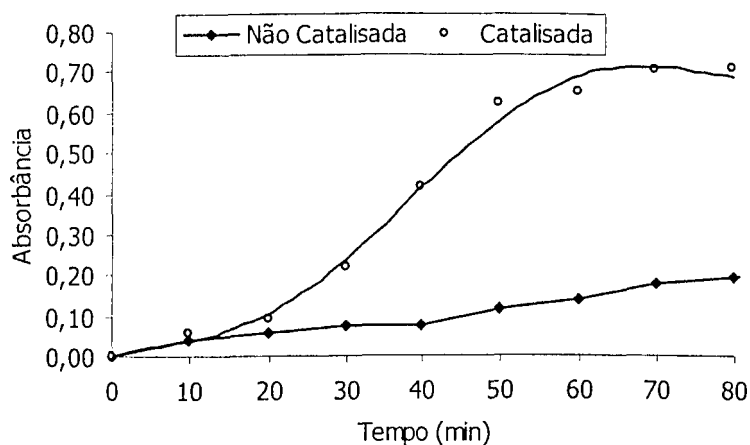


Figura 15 - Estudo da influência do tempo sobre o sinal da reação catalisada e da reação não catalisada a 50 °C.

Se(IV) \rightarrow 1,0 $\mu\text{g/mL}$

DAP $\rightarrow 1,5 \times 10^{-4}$ mol/L

Glioxal $\rightarrow 1,4 \times 10^{-2}$ mol/L

H₃PO₂ $\rightarrow 8,0 \times 10^{-2}$ mol/L

Os resultados mostram que o sinal da reação catalisada varia até por volta de 70 minutos e depois atinge uma condição de estabilidade (equilíbrio), porém a reação não catalisada continua aumentando o sinal. Isso pode ser entendido com base no fato de que a reação catalisada atinge o equilíbrio, porém a não catalisada continua a progredir. A consequência disto é apresentada no gráfico da figura 16.

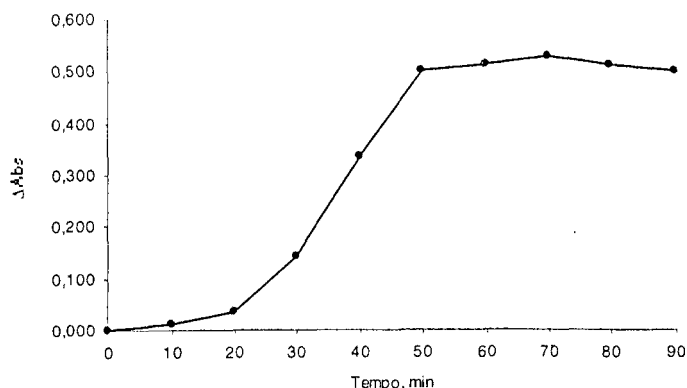


Figura 16 - Variação do $\Delta Absorbância$ entre as reações catalisada e não catalisada.

Observa-se que em 70 minutos de reação obtêm-se o valor máximo da diferença de sinal entre a reação catalisada e a não catalisada e, após este tempo parece haver uma perda de sinal. Dessa forma definiu-se um tempo de reação de 70 minutos.

Nesse tempo foi obtido um espectro do DHTAN para a reação catalisada e não catalisada, que está apresentado na figura 17.

Pode se observar que o ΔAbs entre a reação catalisada e a não catalisada é bastante expressivo. Isso mostra claramente o papel catalítico do selênio sobre a reação de redução do TAN a DHTAN pelo H_3PO_2 .

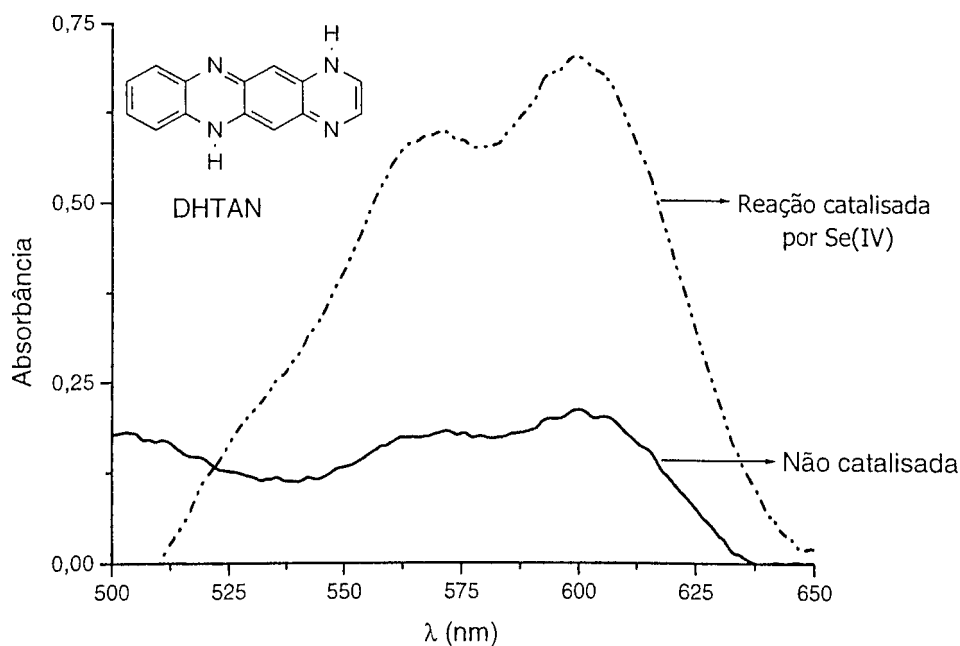


Figura 17 - Espectros de absorção para o DHTAN após 70 minutos de reação.

Se(IV) \rightarrow 1,0 $\mu\text{g/mL}$

DAP $\rightarrow 1,5 \times 10^{-4}$ mol/L

Glioxal $\rightarrow 1,4 \times 10^{-2}$ mol/L

H₃PO₂ $\rightarrow 8,0 \times 10^{-2}$ mol/L

Espectro obtido em um espectrofotômetro de varredura HP modelo 8453 usando cela de quartzo com caminho óptico de 1cm.

IV.3) REDUÇÃO DO TAN A DHTAN NO SISTEMA DE AFCM

Depois de definido o tempo de reação, procedeu-se a uma adaptação da reação ao sistema de AFCM apresentado na figura 11 (procedimento experimental). Este tempo poderia ter sido determinado no próprio sistema AFCM por uma parada de fluxo (stop-flow), porém como a reação deve ser conduzida à temperatura de 50 °C, isto não foi possível já que o compartimento de cela do espectrofotômetro não é dotado de um sistema para fornecer tal temperatura. No intuito de se obter os melhores resultados possíveis procedeu-se ao estudo de alguns parâmetros instrumentais e químicos importantes para a reação.

IV.4) AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA BOBINA DE REAÇÃO

O comprimento da bobina de reação foi selecionado tendo como compromisso uma adequação desta com o tempo de reação de forma a se obter boa sensibilidade (baixa dispersão depois de retirada a bolha), tempo de limpeza e frequência analítica. Utilizando-se uma bobina muito pequena, o fluxo deveria ser pequeno para dar tempo à reação e com isso teria-se no momento da leitura uma dispersão muito grande, devido ao fluxo baixo, o que acarretaria uma diminuição do sinal analítico. Além disso, ter-se-ia um retorno lento à linha base, diminuindo assim a frequência analítica. Dessa forma definiu-se uma bobina de reação com 10 metros de comprimento, mostrando-se conveniente para tal determinação.

IV.5) AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA ALÇA DE AMOSTRAGEM

Estudou-se o efeito da alça de amostragem para volumes de 100 a 1000 μL . O gráfico da figura 18 apresenta os resultados obtidos.

Com relação ao volume injetado de amostra, os sinais analíticos aumentaram com o aumento da alça de amostragem até 1000 μL .

Apesar de alças maiores que 600 μL (frequência de 50 amostras/hora) também promoverem aumento do sinal analítico, estas reduziriam a frequência de amostragem devido a um maior tempo de limpeza. Como compromisso entre sensibilidade e velocidade analítica, a alça de 600 μL foi selecionada para os estudos posteriores.

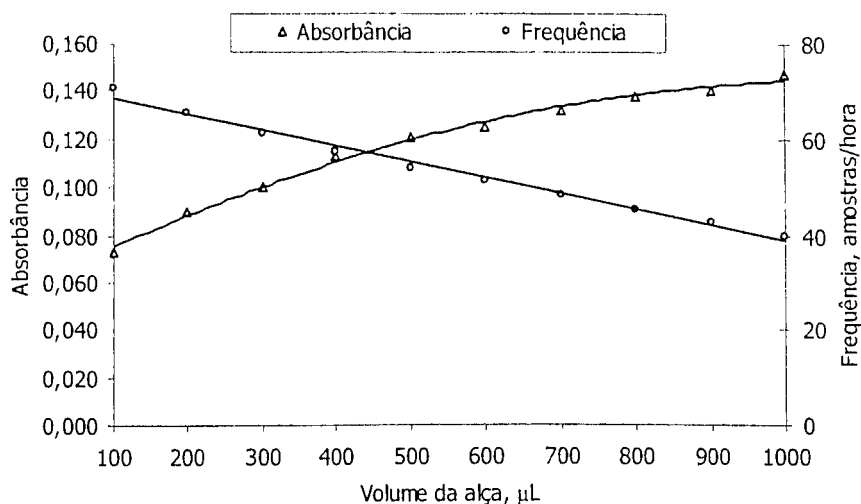


Figura 18 - Efeito do volume da alça de amostragem sobre a frequência.

Se(IV) \rightarrow 1,0 µg/mL

DAP \rightarrow $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L

Glioxal \rightarrow $1,4 \times 10^{-2}$ mol/L

H₃PO₂ \rightarrow $8,0 \times 10^{-2}$ mol/L

IV.6) INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE HCl NO MEIO REACIONAL

Como se pode observar a reação de redução do TAN a DHTAN necessita de um meio ácido para ocorrer (figura 10). Assim, procedeu-se a um estudo da influência da concentração de H⁺ sobre a reação. O ácido utilizado foi HCl uma vez que este ácido é usado para se fazer a redução de Se(VI) a Se(IV) e dessa forma é uma espécie que faz parte do meio reacional. As concentrações de HCl avaliadas foram de 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 e 0,60 mol/L. O gráfico da figura 19 apresenta os resultados obtidos.

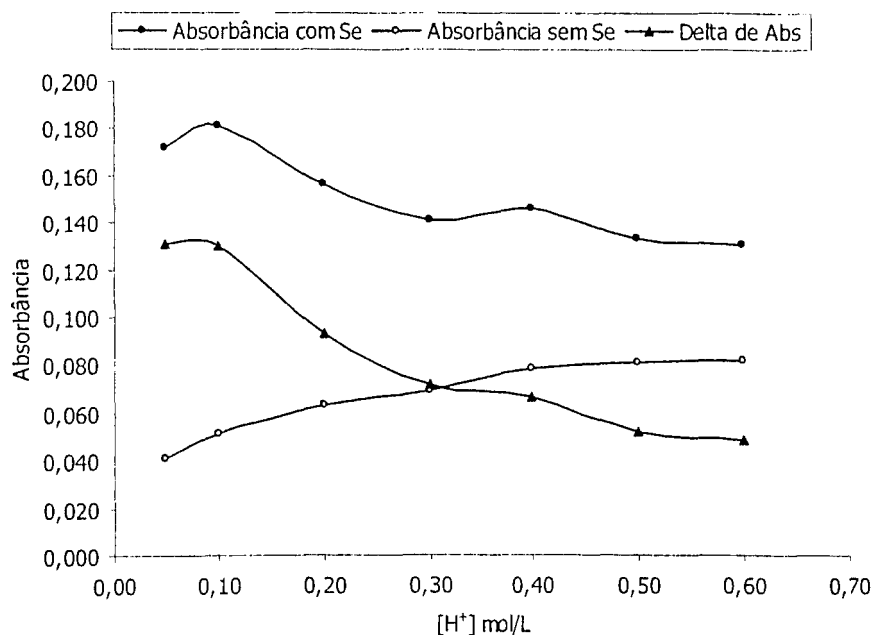


Figura 19 - Estudo da influência da concentração hidrogeniônica sobre o sinal analítico das reações catalisada e não catalisada.
Estudo realizado fora do sistema AFCM.

Como se pode observar na figura 19 a maior variação no valor do sinal entre a reação catalisada (com selênio) e a não catalisada (sem selênio) ocorre para valores de concentração entre 0,05 e 0,10 mol/L de HCl. Enquanto se observa uma diminuição do sinal com o aumento da concentração de HCl para a reação catalisada, ocorre o inverso para a reação não catalisada. Isso significa que HCl em concentrações maiores do que 0,10 mol/L provavelmente inibe a ação do selênio sobre a reação de redução ou até mesmo de outras espécies reagentes.

Considerando este comportamento, optou-se por utilizar uma concentração de HCl igual a 0,05 mol/L no sistema em estudo. Este ácido é introduzido no preparo da solução de DAP, uma vez que o meio ácido favorece a sua solubilização.

A opção pela concentração de 0,05 mol/L se deu com base no fato de que a próxima etapa a ser executada inclui a otimização da concentração de ácido hipofosforoso (H₃PO₂). Sendo este o agente redutor, ou seja, responsável pela transformação do TAN em DHTAN, pode ser que durante a otimização o sistema requeira um aumento na concentração de H₃PO₂. Por ser um ácido este aumentaria também o nível de H⁺ no meio reacional, o que diminuiria o sinal analítico caso se

utilizasse HCl 0,10 mol/L. O efeito disto seria a supressão do efeito redutor do ácido hipofosforoso.

Utilizando-se a concentração de 0,05 mol/L, tem-se um sinal analítico equivalente à utilização de HCl 0,10 mol/L, além de dar uma certa liberdade ao sistema para aumentar a concentração de H_3PO_2 no sistema, quando da aplicação da otimização pela metodologia da superfície de resposta.

IV.7) OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE H_3PO_2 E GLIOXAL NA REDUÇÃO DO TAN A DHTAN

Um dos maiores desafios da química analítica é o desenvolvimento de metodologia simples, com alta sensibilidade e baixo limite de detecção. Uma possibilidade para aumentar a sensibilidade de um método catalítico é o aumento da temperatura do meio reacional, porém neste sistema não se pode utilizá-la já que a uma temperatura acima de 50 °C o DHTAN se decompõe.⁽³⁴⁾ Isto ocasionaria uma diminuição do sinal analítico.

Quando se deseja analisar um conjunto de duas ou mais variáveis simultaneamente, uma alternativa é o emprego de técnicas quimiométricas tal como o planejamento fatorial e a metodologia de superfícies de respostas (MSR). Esta técnica se baseia em planejamentos fatoriais e foi introduzida por G. E. P. Box nos anos cinquenta, e desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais.⁽⁵¹⁾ A finalidade da MRS é atingir uma região ótima da superfície de respostas investigada.

O planejamento fatorial⁽⁵²⁾ é uma ferramenta estatística importante e simples de ser empregada nos mais diversos campos da ciência. Neste sentido, foram selecionadas as concentrações de ácido hipofosforoso e glioxal como sendo as variáveis do sistema em estudo. A concentração de DAP não foi avaliada no estudo, uma vez que este reagente na concentração em que está sendo usado encontra-se no seu limite máximo de solubilidade. A observação dos efeitos de variáveis e interações entre elas é de extrema importância para entender os processos que estão sendo monitorados em um determinado sistema. Quando se emprega uma otimização univariada, não é possível detectar interações entre as variáveis estudadas, pois na estratégia de otimização univariada, poder-se-ia, inicialmente, fixar a concentração de H_3PO_2 , variando-se somente a do glioxal.⁽⁵¹⁾

Em seguida, depois de encontrar a melhor concentração de glicoxal, a concentração de H_3PO_2 seria variada. Neste tipo de procedimento, alguns resultados e interpretações incompletas podem ocorrer, devido ao fato de que os efeitos de interação entre as variáveis não são explorados. Além do problema relatado anteriormente, o número de experimentos executados é geralmente maior quando comparado com aqueles executados durante um planejamento fatorial.^(51,52)

Para executar o planejamento fatorial, obter a superfície de resposta e otimizar a resposta catalítica do selênio procedeu-se ao estudo da influência das concentrações de H_3PO_2 e glicoxal iniciando com valores de concentrações $8,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ e $1,4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, respectivamente. Essas concentrações foram as mesmas utilizadas nos estudos anteriores. As concentrações de DAP e Se(IV) utilizadas foram $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ e $1,0 \text{ } \mu\text{g/L}$, respectivamente. Estes valores são denominados de pontos centrais do planejamento e, a concentração de H_3PO_2 é variada de $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ a $12,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, enquanto que a concentração de glicoxal varia de $0,6 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ a $2,2 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$.

Desta forma empregou-se um planejamento fatorial com 11 experimentos. Este fatorial possui dois níveis relativos, sendo um a menor (-1) e o outro a maior (+1) concentração para cada espécie. No caso do glicoxal, estes níveis podem ser obtidos pela subtração do valor médio $1,4 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ de cada um dos valores extremos ($0,6 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ e $2,2 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$), e dividir o resultado pela metade da amplitude da variação, que é a diferença entre o valor superior e o valor inferior.⁽⁵¹⁾ Este processo é denominado de codificação, normalização ou escalonamento.

Matematicamente tem-se:⁽⁵³⁾

$$X_n = \frac{X_{\text{Real}} - X_{\text{médio}}}{\frac{\Delta X}{2}} \text{ onde,}$$

$X_n \rightarrow$ Variável codificada;

$X_{\text{Real}} \rightarrow$ Valor real da variável codificada;

$X_{\text{médio}} \rightarrow$ Valor médio da amplitude de variação da variável;

$\Delta X \rightarrow$ Diferença entre o valor superior e inferior da variável.

Da expressão acima, obtém-se as equações de codificação para o H_3PO_2 e o glicoxal, respectivamente, apresentadas a seguir.

$$X_1 = \frac{X_{H_3PO_2} - 8,0 \times 10^{-2}}{4,0 \times 10^{-2}}$$

$$X_2 = \frac{X_{\text{Glioxal}} - 1,4 \times 10^{-2}}{8,0 \times 10^{-3}}$$

A tabela 3 apresenta as variáveis codificadas bem como as leituras de absorbância para cada um dos experimentos realizados.

Tabela 3 - Resultados do planejamento em estrela.

Ensaio	[H ₃ PO ₂], mol/L	[Glioxal], mol/L	X ₁	X ₂	ΔAbs
1	0,040	0,006	-1	-1	0,011
2	0,120	0,006	+1	-1	0,104
3	0,040	0,022	-1	+1	0,049
4	0,120	0,022	+1	+1	0,266
5	0,080	0,014	0	0	0,128
6	0,080	0,014	0	0	0,128
7	0,080	0,014	0	0	0,131
8	0,023	0,014	$-\sqrt{2}$	0	0,017
9	0,080	0,025	0	$\sqrt{2}$	0,223
10	0,137	0,014	$\sqrt{2}$	0	0,276
11	0,080	0,003	0	$-\sqrt{2}$	0,031

Observando-se a tabela anterior tem-se que as concentrações foram codificadas entre -1 e +1. Além disso, foram realizados três experimentos no ponto central (concentrações codificadas em 0) para cálculo do erro, e 4 experimentos em estrela (concentrações codificadas entre $-\sqrt{2}$ e $+\sqrt{2}$).

A configuração dos experimentos pode ser visualizada na figura 20, onde o quadrado com círculos sólidos nas arestas representa o fatorial 2^2 , o círculo aberto no centro representa o ponto central, e o losango com quadrados sólidos nas arestas representa o fatorial em estrela.

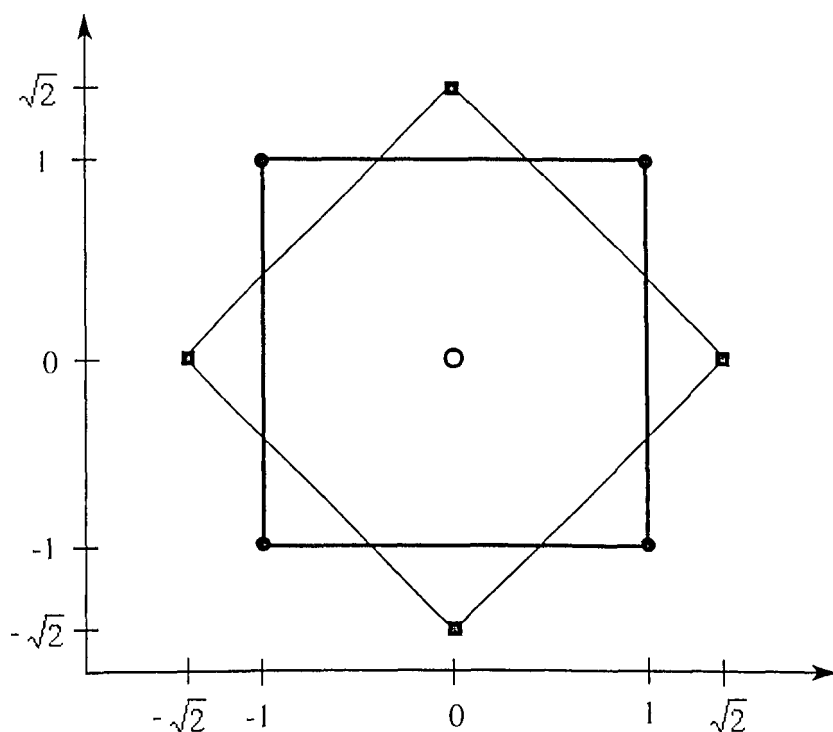


Figura 20 - Representação do planejamento fatorial. Quadrado com círculos sólidos representa o fatorial 2^2 , círculo aberto no centro da figura representa o ponto central e o losango com quadrados sólidos representa o fatorial em estrela.

A primeira análise que se pode fazer dos resultados da tabela 3 é a magnitude dos efeitos principais e de interação das variáveis em estudo.

O efeito principal da concentração de H_3PO_2 é dado pela média dos efeitos desta variável nos dois níveis de concentração do glioxal (-1 e +1). Utilizando a letra **A** para representar esse efeito e sendo $\bar{\Delta}_i$ o delta de absorbância médio obtido para o i -ésimo ensaio, segue que

$$A = \frac{(\bar{\Delta}_2 - \bar{\Delta}_1) + (\bar{\Delta}_4 - \bar{\Delta}_3)}{2}$$

A escolha dos sinais se dá pela notação usada na tabela 3, onde para o H_3PO_2 os ensaios 2 e 4 apresentam sinal positivo enquanto os ensaios 1 e 3 possuem sinal negativo.

Aplicando-se as médias de Δ Absorbância da tabela 3 à última expressão tem-se que

$$A = 0,155$$

Este resultado indica que o sinal analítico (Δ Absorbância) aumenta em média 0,155 quando a concentração de H_3PO_2 passa do nível inferior ($4,0 \times 10^{-2}$

mol/L) para o nível superior ($12,0 \times 10^{-2}$ mol/L). Este resultado é condizente com a idéia de que sendo o H_3PO_2 o agente redutor um aumento de sua concentração iria aumentar o sinal analítico. Sendo assim, no estudo de acidez, a escolha da concentração de HCl em 0,05 mol/L foi a mais adequada.

De modo análogo, pode-se calcular o efeito principal da concentração do glioxal. Considera-se que tal efeito seja representado pela letra **G**. Para o glioxal tem-se os ensaios 3 e 4 com sinais positivos, enquanto 1 e 2 são negativos. A equação abaixo expressa o cálculo de **G**.

$$G = \frac{(\bar{\Delta}_3 + \bar{\Delta}_4) - (\bar{\Delta}_1 + \bar{\Delta}_2)}{2}, \text{ portanto;}$$

$$G = 0,100$$

Da mesma forma este resultado significa que um aumento na concentração de glioxal do nível inferior para o nível superior gera em média um aumento de 0,100 no sinal analítico.

Este fato concorda com a lei da velocidade encontrada por Kawashima e Miwa para a reação.⁽⁴¹⁾

Considerando **AG** o efeito de interação entre as concentrações de H_3PO_2 e glioxal, a expressão que permite se fazer o cálculo da interação entre essas duas variáveis é apresentada a seguir.

$$AG = \left(\frac{\bar{\Delta}_4 - \bar{\Delta}_3}{2} \right) - \left(\frac{\bar{\Delta}_2 - \bar{\Delta}_1}{2} \right) = \left(\frac{\bar{\Delta}_1 + \bar{\Delta}_4}{2} \right) - \left(\frac{\bar{\Delta}_2 + \bar{\Delta}_3}{2} \right)$$

Os sinais desta expressão são obtidos pela multiplicação algébrica das variáveis codificadas nos dois níveis de cada ensaio. Esta e as outras expressões anteriores têm uma característica própria do planejamento fatorial que é utilizar todas as respostas obtidas do planejamento para o calcular os efeitos.

Aplicando os resultados apresentados na tabela 3 à última expressão obtém-se que

$$AG = 0,062$$

Conclui-se desse resultado que há um efeito de interação entre as duas variáveis estudadas, cuja interpretação indica que quando se aumentam simultaneamente as concentrações de H_3PO_2 e glioxal há em média um ganho de 0,062 no sinal analítico. Entretanto, comparando o efeito de interação com os

efeitos principais de cada variável observa-se que os últimos são bem mais expressivos do que o primeiro.

Utilizando-se agora o planejamento fatorial, o planejamento em estrela e o ponto central, é possível obter-se uma equação de segunda ordem, conhecida também como modelo quadrático, cuja expressão geral, neste caso em estudo (duas variáveis) é dada por,

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

onde b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} e b_{12} são estimadores dos parâmetros do modelo quadrático e x_1 e x_2 representam os fatores codificados, que neste caso é H_3PO_2 e glioxal respectivamente.

Os estimadores dos parâmetros podem ser obtidos pelo método denominado de ajuste por mínimos quadrados. Pode-se lançar mão de várias equações para proceder a estes cálculos, porém uma das melhores formas é a utilização de equações matriciais. Uma discussão detalhada pode ser encontrada em Barros Neto et. al..⁽⁵¹⁾ Entretanto, dependendo do número de fatores, estes cálculos manuais seriam trabalhosos, já que envolveriam uma grande quantidade de manipulações numéricas, e sendo assim a utilização de programas computacionais para este fim é uma prática comum hoje em dia. Neste trabalho estes cálculos matriciais foram realizados utilizando-se o software *Scilab 3.0* [Copyright (c) 1989-2004 - Consortium Scilab (INRIA, ENPC)] disponibilizado gratuitamente na rede mundial de computadores. O apêndice 3 apresenta de forma simplificada a rotina utilizada para o trabalho com tais matrizes neste programa.

Primeiramente obtém-se a matriz X (11×6) em que suas seis colunas correspondem aos seis termos do modelo quadrático nessa ordem (b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} e b_{12}).

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -\sqrt{2} & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & \sqrt{2} & 0 & 2 & 0 \\ 1 & \sqrt{2} & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -\sqrt{2} & 0 & 2 & 0 \end{bmatrix}$$

A primeira coluna da matriz refere-se ao termo independente b_0 , enquanto que a segunda e terceira colunas correspondem aos valores codificados dos fatores x_1 e x_2 . As três próximas colunas referem-se a x_1^2 , x_2^2 e x_1x_2 , nesta ordem. Para obtê-las eleva-se ao quadrado ou multiplica-se as colunas referentes aos fatores x_1 e x_2 dispostos na matriz \mathbf{X} ou na tabela 3. Considerando ainda a tabela 3 tem-se na última coluna o valor de absorbância obtido em cada ensaio. Estes valores constituem o que se denomina de vetor \mathbf{y} . Assim ter-se-á que:

$$\mathbf{y} = \begin{bmatrix} 0,011 \\ 0,104 \\ 0,049 \\ 0,266 \\ 0,128 \\ 0,128 \\ 0,131 \\ 0,017 \\ 0,223 \\ 0,276 \\ 0,031 \end{bmatrix}$$

Seguindo o procedimento recomendado em Barros Neto et. al.⁽⁵¹⁾, calcula-se $\mathbf{X}^t\mathbf{X}$ e $\mathbf{X}^t\mathbf{y}$ (onde \mathbf{X}^t refere-se à matriz transposta de \mathbf{X}).

$$\mathbf{X}'\mathbf{X} = \begin{bmatrix} 11 & 0 & 0 & 8 & 8 & 0 \\ 0 & 8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 8 & 0 & 0 & 0 \\ 8 & 0 & 0 & 12 & 4 & 0 \\ 8 & 0 & 0 & 4 & 12 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 4 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \mathbf{X}'\mathbf{y} = \begin{bmatrix} 1,364 \\ 0,676 \\ 0,472 \\ 1,016 \\ 0,938 \\ 0,124 \end{bmatrix}$$

Em seguida faz-se o cálculo da matriz inversa de $\mathbf{X}'\mathbf{X}$, obtendo:

$$(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} = \begin{bmatrix} 1/3 & 0 & 0 & -1/6 & -1/6 & 0 \\ 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 \\ -1/6 & 0 & 0 & 17/96 & 5/96 & 0 \\ -1/6 & 0 & 0 & 5/96 & 17/96 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/4 \end{bmatrix}$$

A partir dessas matrizes pode-se obter o vetor \mathbf{b} que contém os valores numéricos dos estimadores dos parâmetros do modelo quadrático, conforme apresentado na operação a seguir:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y}$$

$$\mathbf{b} = \begin{bmatrix} 1/3 & 0 & 0 & -1/6 & -1/6 & 0 \\ 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/8 & 0 & 0 & 0 \\ -1/6 & 0 & 0 & 17/96 & 5/96 & 0 \\ -1/6 & 0 & 0 & 5/96 & 17/96 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/4 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 1,364 \\ 0,676 \\ 0,472 \\ 1,016 \\ 0,938 \\ 0,124 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,129 \\ 0,085 \\ 0,059 \\ 0,001 \\ -0,008 \\ 0,031 \end{bmatrix}$$

E dessa forma pode-se obter o modelo quadrático ajustado:

$$y = 0,129 + 0,085x_1 + 0,059x_2 + 0,001x_1^2 - 0,008x_2^2 + 0,031x_1x_2$$

A superfície de resposta correspondente ao modelo ajustado é apresentada na figura 21.

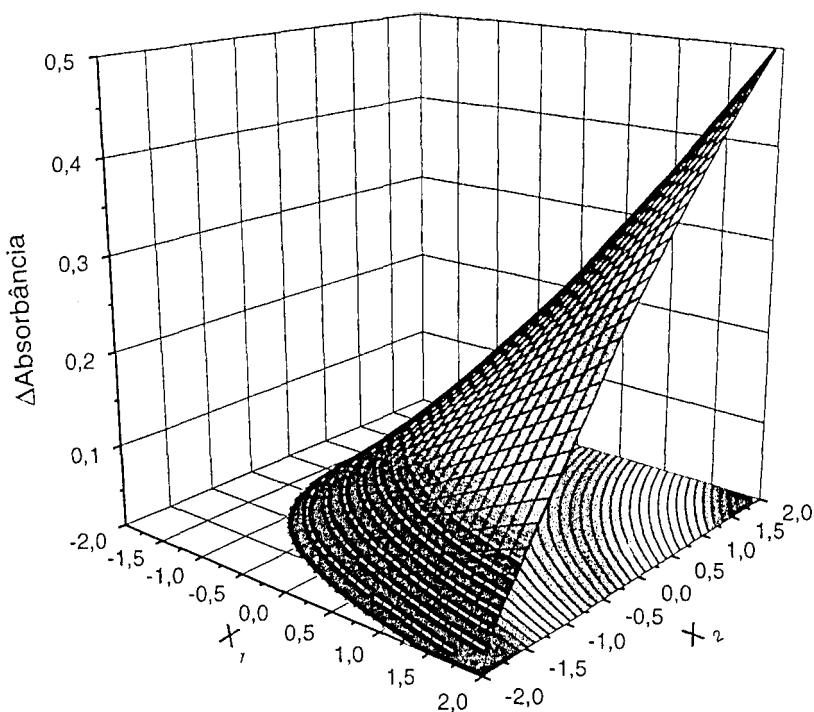


Figura 21 - Superfície de resposta à esquerda, obtida a partir do modelo $y = 0,129 + 0,085x_1 + 0,059x_2 + 0,001x_1^2 - 0,008x_2^2 + 0,031x_1x_2$.
 $X_1 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de H_3PO_2 .
 $X_2 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de glicoxal.

Analisando a superfície da figura 21, evidencia-se uma tendência de aumento do sinal analítico quando se aumenta tanto a concentração de H_3PO_2 como a do glicoxal. Isto pode ser visto mais claramente quando se obtém as curvas de nível da superfície anterior, que está apresentada na figura 22.

Pode-se ver claramente pela seta sobre a figura 22 que à medida que se aumenta simultaneamente a concentração de H_3PO_2 e glicoxal tem-se um aumento do sinal analítico. Porém, ainda não se tem uma região de máximo definida e, assim para se encontrar tal região e quem sabe aumentar ainda mais o sinal analítico deve-se deslocar a região experimental para valores maiores de X_1 e X_2 . Este deslocamento deve ser realizado segundo um caminho em que a superfície obtida tenha a máxima inclinação, uma vez que se procedendo assim, pode-se progredir mais rapidamente em direção às condições de máximo.

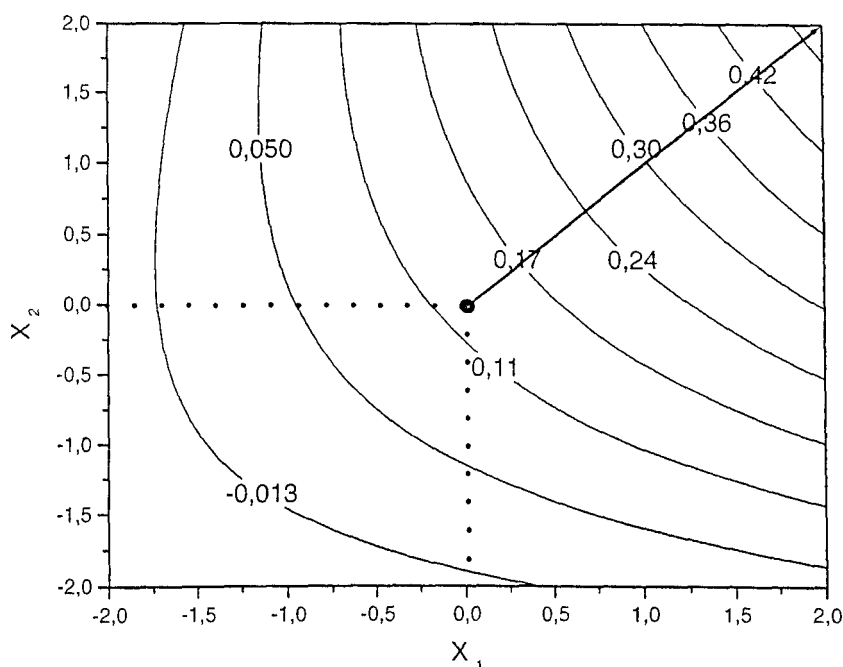


Figura 22 - Curvas de nível descritas pelo modelo $y = 0,129 + 0,084x_1 + 0,059x_2 + 0,001x_1^2 - 0,008x_2^2 + 0,031x_1x_2$. A linha tracejada indica aproximadamente a trajetória de máxima inclinação partindo do ponto central do planejamento.

$X_1 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de H_3PO_2 .

$X_2 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de glioxal.

O caminho de máxima inclinação saindo do ponto central do planejamento está representado pela seta sobre a figura 22. Ele pode ser obtido algebricamente através dos coeficientes dos termos lineares do modelo que neste caso são b_1 e b_2 . Para que se tenha a máxima inclinação, deve se realizar deslocamentos ao longo dos eixos X_2 e X_1 na proporção b_2/b_1 .

A partir dos valores obtidos para estes coeficientes tem-se que $b_2/b_1 = 0,059/0,084 = 0,702$, o que significa que para cada unidade avançada no eixo $X_1(H_3PO_2)$ deve-se avançar apenas 0,702 unidades em X_2 (glioxal). Isto indica que o sistema requer um aumento maior da concentração de H_3PO_2 em relação à concentração de glioxal, para que se aumente o sinal analítico. Esta análise está em acordo com o que foi obtido anteriormente para o efeito principal de cada um dos reagentes, quando então o efeito principal do H_3PO_2 se apresentou maior do que o do glioxal.

A tabela 4 apresenta as coordenadas dos vários pontos ao longo da trajetória de máxima inclinação em termos das variáveis codificadas, os respectivos valores de concentração de H_3PO_2 e glioxal, assim como o valor de absorbância obtido para cada ensaio.

Tabela 4 – Coordenadas do caminho de máxima inclinação para o modelo da figura 21.

<i>Etapa</i>	X_1	X_2	$[H_3PO_2]$	$[glioxal]$	ΔAbs
<i>Centro</i>	0	0	$8,0 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-2}$	0,128
<i>Centro + Δ</i>	1	0,7	$12,0 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$	0,256
<i>Centro + 2Δ</i>	2	1,4	$16,0 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$	0,256
<i>Centro + 3Δ</i>	3	2,1	$20,0 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-2}$	0,233
<i>Centro + 4Δ</i>	4	2,8	$24,0 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-2}$	0,193
<i>Centro + 5Δ</i>	5	3,5	$28,0 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$	0,218

Realizando os experimentos nas condições especificadas obtiveram-se os resultados apresentados anteriormente. Estes podem ser representados graficamente, conforme se faz na figura 23.

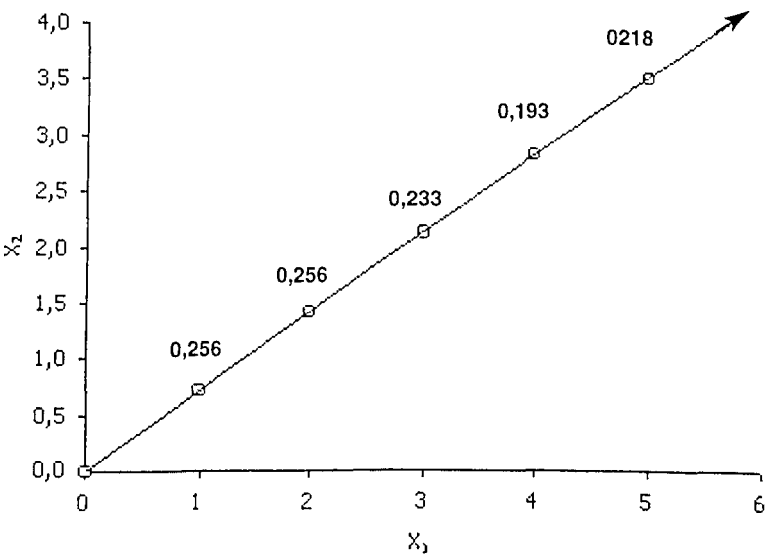


Figura 23 - Resultados dos experimentos realizados na trajetória de máxima inclinação.
 $X_1 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de H_3PO_2 .
 $X_2 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de glioxal.

Observa-se que inicialmente há um aumento do sinal analítico, porém a partir do terceiro experimento tem-se uma diminuição deste. Isto pode ser interpretado como sendo uma situação em que inicialmente está se “escalando” a superfície e a partir do terceiro ensaio se está “descendo” sobre a superfície para uma região de sinais menores e variáveis.

Sendo assim, explorou-se a nova região buscando verificar se há realmente uma condição de máximo. Para isso, faz-se necessário um novo planejamento como o primeiro, porém agora o ponto central (0,0) será nas condições do ensaio que apresentou a melhor resposta. A nova matriz planejamento é apresentada na tabela 5, juntamente com as respostas observadas nos ensaios realizados.

Tabela 5 - Resultados do planejamento em estrela.

Ensaio	[H ₃ PO ₂] , mol/L	[Glioxal], mol/L	X ₁	X ₂	ΔAbs
1	0,080	0,014	-1	-1	0,202
2	0,160	0,014	+1	-1	0,284
3	0,080	0,030	-1	+1	0,242
4	0,160	0,030	+1	+1	0,266
5	0,120	0,022	0	0	0,271
6	0,120	0,022	0	0	0,272
7	0,120	0,022	0	0	0,276
8	0,063	0,022	$-\sqrt{2}$	0	0,203
9	0,120	0,033	0	$\sqrt{2}$	0,253
10	0,177	0,022	$\sqrt{2}$	0	0,277
11	0,120	0,011	0	$-\sqrt{2}$	0,249

A partir dos resultados apresentados na tabela 5 e dos cálculos matriciais obtém-se um novo modelo quadrático que é dado por:

$$y = 0,273 + 0,026x_1 + 0,004x_2 - 0,016x_1^2 - 0,010x_2^2 - 0,015x_1x_2$$

A superfície de resposta correspondente a este modelo está apresentada na figura 24.

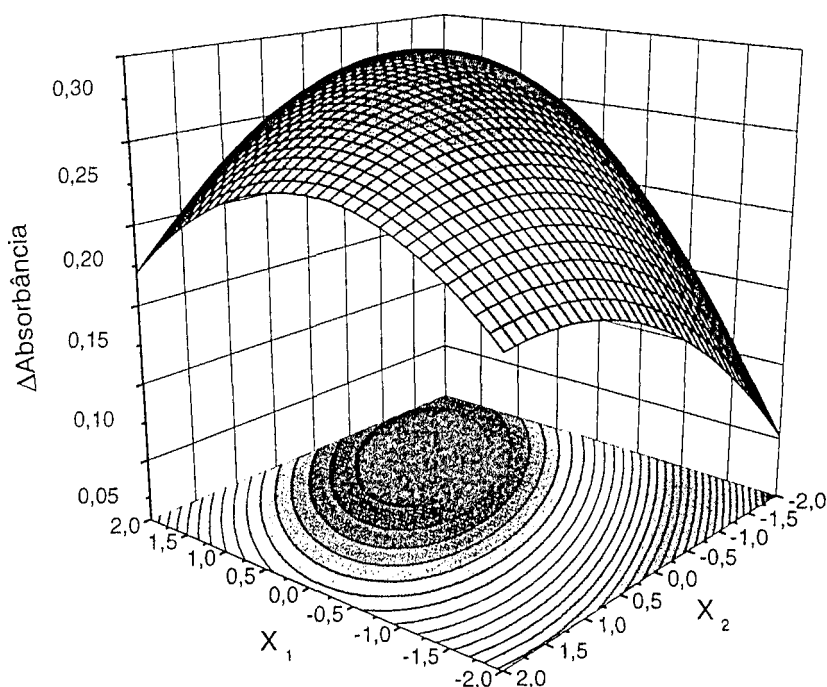


Figura 24 - Superfície de resposta obtida a partir do modelo $y = 0,273 + 0,026x_1 + 0,004x_2 - 0,016x_1^2 - 0,010x_2^2 - 0,015x_1x_2$.
 $X_1 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de H_3PO_2 .
 $X_2 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de glioxal.

Analisando a figura anterior já se pode observar pelas projeções a obtenção de um ponto de máximo. Isto fica mais claro quando se obtém as curvas de nível dessa superfície, conforme apresentado na figura 25.

A superfície tem um ponto máximo situado aproximadamente em $X_1 = 1$ e $X_2 = -1$. Isto corresponde a uma $[H_3PO_2] = 0,160$ mol/L e uma $[Glioxal] = 0,014$ mol/L. Quando se analisa o valor de absorbância nesse ponto ($\Delta Abs = 0,284$) em relação ao valor obtido no ponto central do primeiro planejamento ($\Delta Abs = 0,129$), que foram as condições iniciais, tem-se um ganho de 120% no sinal analítico. Isso evidencia a eficiência da metodologia de superfície de resposta empregada nesta otimização.

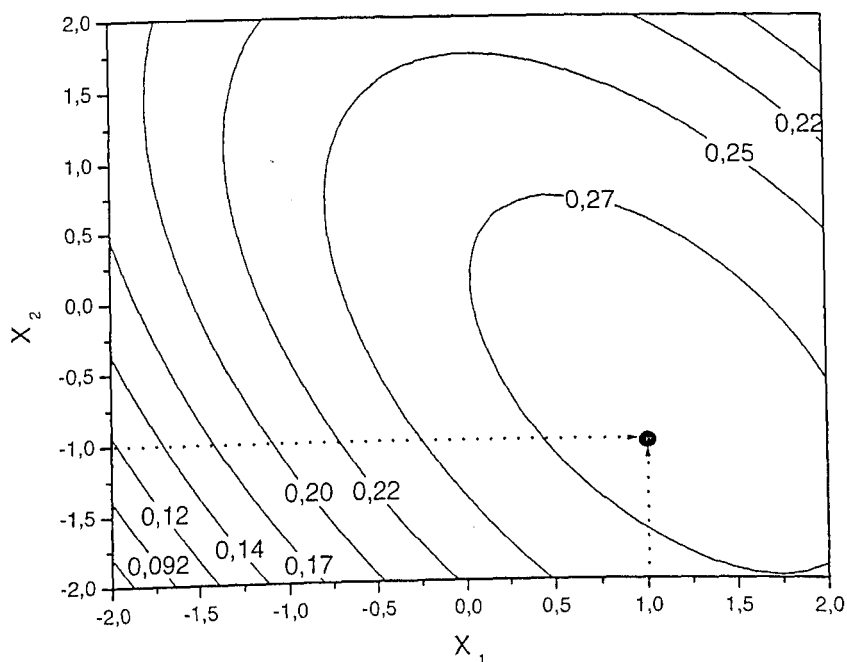


Figura 25 - Curvas de nível descritas pelo modelo $y = 0,273 + 0,026x_1 + 0,004x_2 - 0,016x_1^2 - 0,010x_2^2 - 0,015x_1x_2$. A linha tracejada é a trajetória de máxima inclinação partindo do ponto central do planejamento.
 $x_1 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de H_3PO_2 .
 $x_2 \rightarrow$ variável escalonada para a concentração de glioxal.

Uma vez otimizada as condições fez-se uma curva analítica de calibração, apresentada na figura 26.

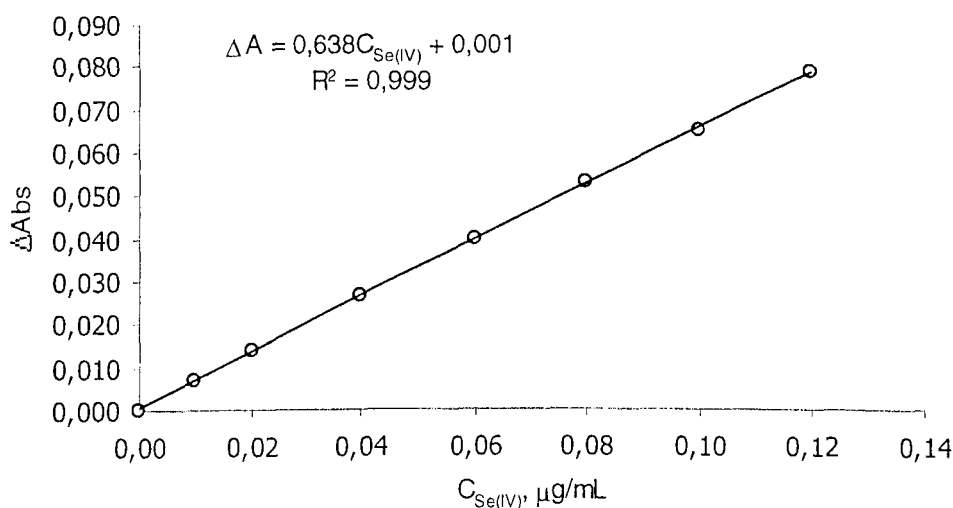


Figura 26 - Curva analítica de calibração para a determinação de Se(IV).
 → limite de detecção de 3,1 ng/mL calculado em relação ao desvio padrão do branco
 → limite de quantificação de 14,1 ng/mL calculado em relação ao desvio padrão do branco
 → faixa linear de 0,01 – 0,12 $\mu g/mL$.

A curva analítica de calibração apresentada na figura 26 apresenta um limite de detecção ($LD = 3s_{branco}$) de 3,1 ng/mL e limite de quantificação ($LQ = 10s_{branco}$) de 14,1 ng/mL, calculado em relação ao desvio padrão do branco ($s_{branco} = 0,001$) ($n = 10$ ensaios), e possui faixa linear de 0,01 – 0,12 $\mu g/mL$.

IV.8) AVALIAÇÃO DO ÍON BROMETO COMO ATIVADOR

Como citado anteriormente um dos maiores desafios da química analítica é o desenvolvimento de metodologia simples, com alta sensibilidade e baixo limite de detecção.

Além das possibilidades já mencionadas para se aumentar a sensibilidade de um método catalítico, ressalta-se ainda a utilização de um indicador com alta absorvidade molar (ϵ), quando então se dá preferência ao emprego de corantes altamente sensíveis para tais determinações.^(21,54)

Por outro lado, é muito comum a utilização de um ativador juntamente com o catalisador da reação para aumentar o sinal analítico.⁽⁵⁶⁾

Por definição, um ativador é uma substância que não catalisa a reação, mas aumenta fortemente sua velocidade na presença de certos catalisadores.

Sendo assim, a ativação é uma modificação do efeito catalítico que do ponto de vista analítico, dá uma melhor sensibilidade e um limite de detecção mais baixo em uma determinação catalítica.

Os mecanismos de ação dos ativadores no processo catalítico podem diferir consideravelmente de uma situação para outra dependendo primordialmente do tipo de interação entre catalisador-ativador e a etapa da reação afetada pela presença do ativador. Isto levou a classificação dos ativadores em três grupos:

- ativadores que afetam a interação do catalisador com o reagente;
- catalisadores que participam da regeneração do catalisador;
- ativadores que atuam indiretamente no processo catalítico.

Uma discussão detalhada sobre estes grupos pode ser encontrada em Bontchev⁽⁵⁴⁾ e Mottola.⁽²¹⁾

Kawashima e seus colaboradores⁽⁴¹⁾ encontraram que o íon brometo pode ser utilizado como ativador na reação de redução do TAN a DHTAN. Entretanto, não é entendido o mecanismo pelo qual este íon atua sobre a reação em estudo.

No sentido de aumentar o sinal analítico para a determinação de selênio, procedeu-se a um estudo da influência desse íon sobre o sistema. Utilizando concentrações constantes de todos os reagentes envolvidos na reação, estudou-se o comportamento do sinal analítico em relação à variação de concentração do íon brometo no meio, para uma solução de Se(IV) 0,10 µg/mL. As concentrações de íons brometo foram de 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200 e 250 mmol/L.

O gráfico da figura 27 apresenta os resultados obtidos para o estudo.

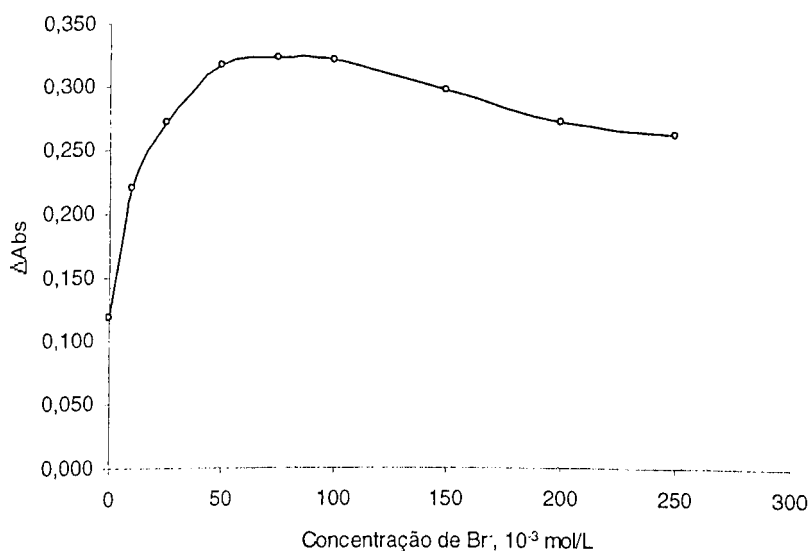


Figura 27 - Influência da concentração de íon Br^- no sinal analítico para determinação de Se(IV) .

Estudo realizado fora do sistema AFCM e Se(IV) na concentração de $0,10 \mu\text{g/mL}$.

Analisando o gráfico da figura 27, vê-se que na medida em que a concentração do íon brometo é aumentada ocorre um aumento no sinal analítico atingindo um certo patamar na faixa de $50 \times 10^{-3} - 100 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. A partir desta concentração observa-se uma queda no sinal analítico. Este comportamento é característico de vários ativadores.^(55,56) Com base nestes resultados optou-se por usar uma concentração de 75 mmol/L do referido ativador no sistema.

Definida a concentração ótima do ativador obteve-se uma curva analítica de calibração para o Se(IV) , a qual é dada pela equação $\Delta\text{Abs} = 1,173C_{\text{Se(IV)}} + 0,0014$ com uma correlação $r^2 = 0,9993$ e limite de detecção ($\text{LD} = 3s_{\text{branco}}$) de $2,6 \text{ ng/mL}$, calculado em relação ao desvio padrão do branco para um conjunto de 8 replicatas que apresentaram um $s_{\text{branco}} = 0,0015$; limite de quantificação ($\text{LQ} = 10s_{\text{branco}}$) de $11,6 \text{ ng/mL}$ (INMETRO)⁽⁵⁷⁾ e; linearidade até $0,12 \mu\text{g/mL}$.

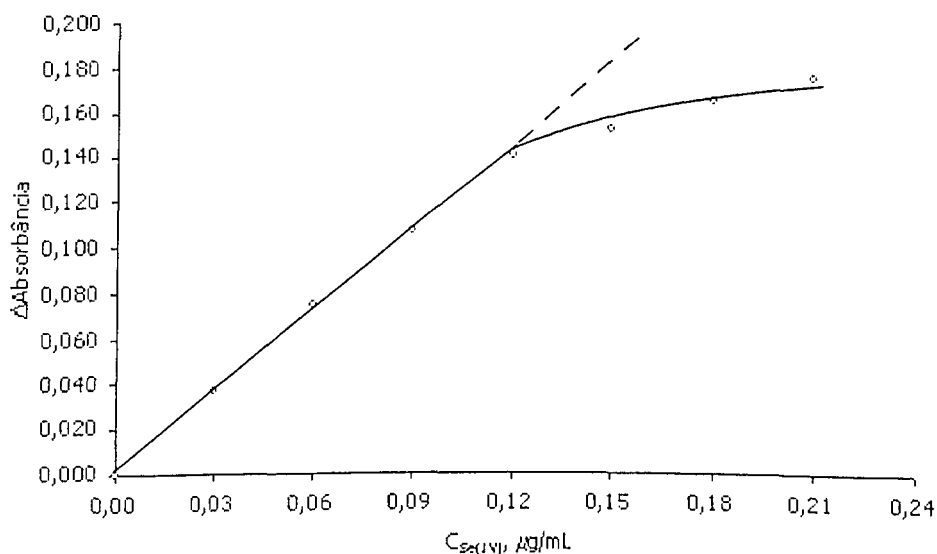


Figura 28 - Curva analítica de calibração para a determinação de Se(IV).
 → LD - limite de detecção de 2,6 ng/mL calculado em relação ao desvio padrão do branco.
 → LQ - limite de quantificação de 11,6 ng/mL
 → faixa linear de 0,01 – 0,12 $\mu\text{g/mL}$.

Comparando os resultados obtidos com uma curva analítica de calibração obtida na ausência do ativador ($\Delta\text{Abs} = 0,638C_{Se(IV)} + 0,0010$) observa-se um aumento de aproximadamente 84% no sinal analítico. A figura 29 compara as duas curvas obtidas na ausência e presença do ativador.

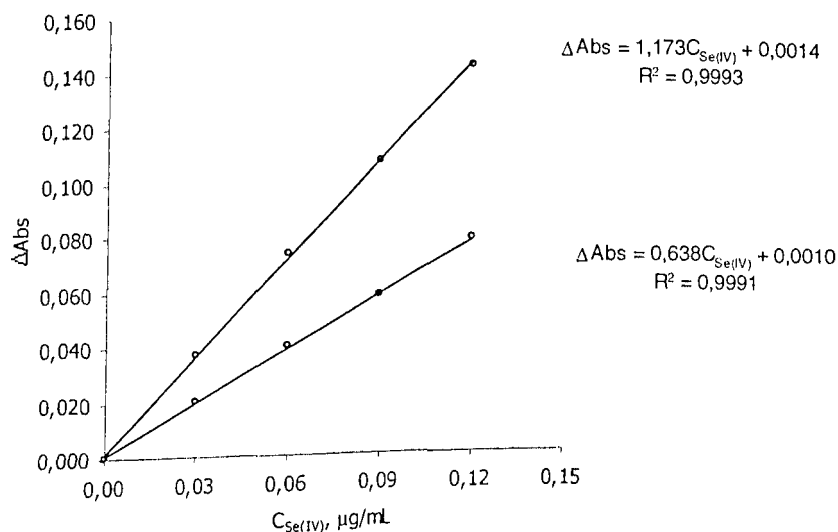


Figura 29 - Curvas analíticas de calibração para a determinação de Se(IV) na presença e na ausência do íon brometo como ativador da reação.

Conclui-se dessa forma que há um ganho considerável de sensibilidade quando se faz uso do íon brometo como ativador da reação. Um fato bastante interessante que já foi colocado é que a reação na ausência de selênio não sofre nenhum efeito do íon brometo, ou seja, tem-se um branco de reagentes que não é afetado pela presença de Br⁻.

IV.9) ESTUDO DE PRECISÃO AO LONGO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Foram escolhidos dois pontos extremos da última curva analítica de calibração, um em 0,02 µg/mL e outro a 0,10 µg/mL para a realização de uma série de 8 ensaios em cada ponto. A tabela 6 apresenta o resultado obtido e o erro relativo para cada ponto.

Tabela 6 – Avaliação do erro em pontos extremos da curva analítica de calibração.

Se(IV), µg/mL	ΔAbs_{obtido}	$\Delta Abs_{previsto}$	Erro relativo (%)
0,02	0,024	0,025	- 3,5
0,10	0,116	0,119	-2,3

Pode-se observar que os erros relativos são pequenos. No extremo superior ele é um pouco menor do que aquele obtido para o extremo inferior, o que pode ser entendido com sendo uma condição em que quanto menor for a concentração a ser determinada maior será a incerteza sobre tal medida.

IV.10) ESTUDO DE ÍONS INTERFERENTES

Uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de uma metodologia analítica é aquela relacionada à sua aplicação em amostras reais. A exatidão de um método depende da sua seletividade sobre o analito. Mesmo os melhores métodos não estão livres de interferência de outras espécies que

modificam o sinal analítico. Interferentes potenciais podem ocorrer na própria amostra de interesse. Neste caso, tem-se como principal problema a interferência de espécies que ocorrem junto com o analito de interesse e, sendo assim alguma ação tem que ser desenvolvida no sentido de eliminar ou minimizar seus efeitos. Aqui cabe então ao analista elaborar uma estratégia simples e eficiente para contornar este inconveniente de forma a se obter uma resposta condizente com o nível real da espécie em estudo na amostra.

Segundo Kawashima e Tanaka⁽⁴⁰⁾ os seguintes elementos não interferem na determinação de selênio usando-se o procedimento recomendado por eles na determinação de 0,106 µg de selênio (em um volume de 6,10 mL de solução final), pelo menos nas quantidades especificadas: Mg(II) (1 mg), Ca(II) (1mg), Co(II) (1 mg), Ni(II) (1mg), Al(III) (1 mg), As(III) (0,15 mg), As(V) (0,15 mg), Zn(II) (0,1 mg), Pb(II) (0,1 mg), Cd(II) (0,1 mg), Sn(IV) (0,1 mg), Mo(VI) (0,01 mg), NaCl (20 mg), KCl (20 mg), NH₄Cl (20 mg), (NH₄)₂SO₄ (20 mg), KNO₃ (20 mg), ácido tartárico (20 mg).

Por outro lado, Ba(II) (1 mg), Fe(III) (1 mg) e Mn(II) (0,01 mg) dão origem a interferência negativa. Com Cu(II) (0,01 mg), V(V) (0,1 mg) e W(VI) (0,1 mg), interferências positivas são observadas. Estes elementos podem atuar como catalisadores no desenvolvimento de cor. A interferência positiva do Sb(III) (240 µg) pode ser eliminada efetivamente por ácido tartárico. Bi(III), Sn(II), Te(IV) e iodeto devem ser evitados, pois o modo de desenvolvimento de cor é diferente na presença desses elementos. Entretanto a presença de Sn(II) e iodeto juntos com Se(IV) na mesma matriz é bastante improvável.

Analisando valores de intervalo de referência para elementos traço no cabelo humano⁽⁴⁵⁾, tem-se que nos valores de concentração acima apenas os íons Cu(II), Zn(II), Fe(III), V(V) e Mn(II) constituem espécies interferentes sobre a metodologia em estudo. A tabela 7 apresenta os intervalos de referência para cada um destes íons no cabelo humano.

Tabela 7 - Intervalos de referência (IR – 68%) para alguns elementos menores e traço em cabelo do escalpo, utilizados para a população urbana do Rio de Janeiro; dados da PUC-Rio.⁽⁴⁵⁾

Elemento	Intervalo (µg/g de cabelo)
Vanádio (V)	0,006 – 0,04
Ferro (Fe)	7,0 – 17
Manganês (Mn)	0,15 – 1,0
Cobre (Cu)	10 – 35
Zinco (Zn)	138 – 240

A partir dos valores de intervalo de referência anteriores, procedeu-se a um estudo de interferência desses íons em dois valores de concentração (0,03 e 0,09 µg/mL de Se(IV)) sobre a curva analítica de calibração representada na figura 28. O valor testado em todos os casos foi sempre o limite superior do intervalo. Sendo assim, necessitou-se de fazer um cálculo da concentração de cada um dos elementos interferentes em uma solução amostra. De acordo com Carneiro et. al.,⁽⁴⁵⁾ o procedimento adotado em tais determinações partia de uma amostra de cabelo com massa 0,250 g e após todo o tratamento de solubilização da mesma esta era diluída para um volume final de 25 mL quando então se procedia com as medidas que resultaram nos intervalos apresentados na tabela 7. A partir daí é possível realizar os cálculos para se determinar as concentrações de cada um dos íons na solução final de 25 mL, conforme apresentado na tabela 8.

Tabela 8 – Valores de concentração de cada interferente nas soluções obtidas de cabelo humano.

Elemento	Intervalo (µg/g de cabelo)	Limite superior (µg/mL)	Concentração estudada, µg/mL
Vanádio (V)	0,006 – 0,04	0,0004	0,0004
Ferro (Fe)	7,0 – 17	0,17	0,20
Manganês (Mn)	0,15 – 1,0	0,01	0,01
Cobre (Cu)	10 – 35	0,35	0,4
Zinco (Zn)	138 – 240	2,4	4

A última coluna da tabela anterior refere-se aos arredondamentos de ordem prática (sempre para cima) dos valores de concentração que foi estudado para cada um dos interferentes. Como Kawashima e Tanaka⁽⁴⁰⁾ realizaram estudos individuais para cada um desses íons na determinação de selênio, optou-se aqui por realizar um estudo da forma que esses íons são realmente encontrados na amostra, ou seja, juntos. Preparando-se soluções nas concentrações especificadas anteriormente realizou-se um estudo na presença e na ausência dos interferentes.

A tabela 9 apresenta os resultados obtidos no estudo, assim como diferença percentual entre o valor esperado e o valor encontrado.

Tabela 9 – Resultados para estudo de interferência.

$[\text{Se(IV)}]_{\text{adicionado}}, \mu\text{g mL}^{-1}$	$[\text{Se(IV)}]_{\text{encontrada}}, \mu\text{g mL}^{-1}$	%diferença
0,03	0,14	365,43
0,09	0,16	80,04

Dos resultados anteriores conclui-se que tais íons nas suas respectivas concentrações interferem fortemente na determinação de selênio. Percebe-se ainda que o problema se torna mais grave para concentrações mais baixas de selênio. De posse desses resultados a estratégia tomada foi a de se fazer uma extração prévia para a eliminação dessas espécies interferentes.

IV.11) ELIMINAÇÃO DOS INTERFERENTES

Dois métodos são geralmente empregados para eliminar interferentes. O primeiro faz uso de agentes mascarantes para imobilizar ou se ligar quimicamente ao interferente de forma que o mesmo não mais contribua para alteração do sinal analítico. O segundo método envolve a conversão do analito ou interferentes em espécies que possam ser separadas uma da outra mecanicamente.^(22,23)

Uma alternativa viável encontrada no presente caso foi a de se fazer uma separação dos íons interferentes através de uma extração líquido-líquido. Para tal empregou-se o dietilditiocarbamato de sódio (NaDDC), cuja estrutura química é apresentada na figura 30.

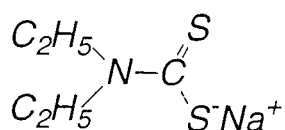
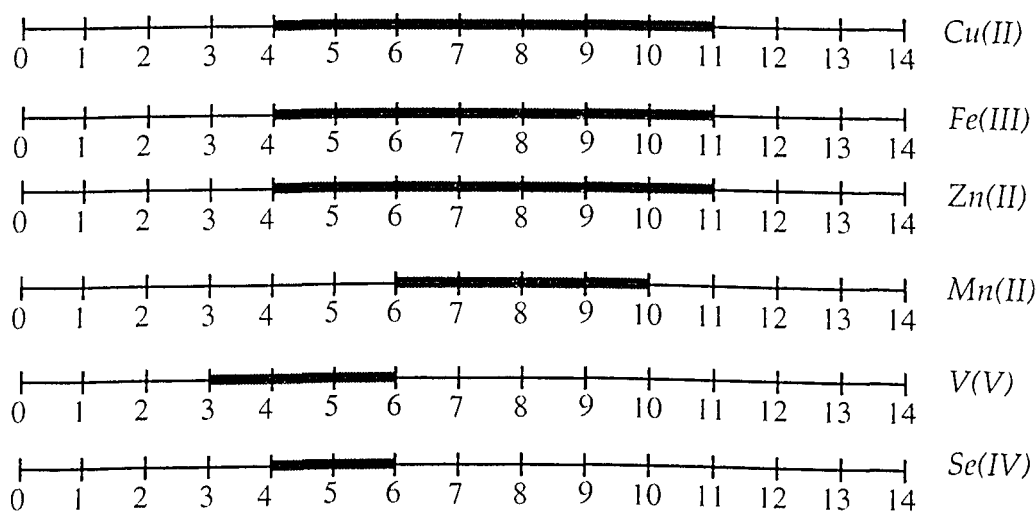


Figura 30 - Estrutura do dietilditiocarbamato de sódio.

Este composto dependendo do pH reage com vários íons para formar complexos que podem ser facilmente extraídos para um solvente orgânico tal como o tetracloreto de carbono. O número de elementos químicos que podem ser extraídos com este reagente é muito grande, porém uma vantagem sobre este tipo de técnica é que com a simples variação do pH pode-se conseguir a separação de várias espécies até mesmo individualmente. A figura 31 apresenta os intervalos de pH em que os interferentes anteriormente citados podem ser extraídos.⁽⁵⁰⁾



— Faixa de pH para extração quantitativa com NaDDC

Figura 31 - Faixa ótima de pH para extração quantitativa de íons com NaDDC e tetracloreto de carbono.

Conforme pode ser verificado na figura anterior todos os íons interferentes assim como o analito (Se(IV)) podem ser extraídos com o NaDDC em uma dada faixa de pH. É importante salientar aqui que em pH 7,5 Se(IV) praticamente não é extraído com NaDDC. Daí pode-se concluir da figura que se o pH do meio for alterado para 10 consegue-se realizar a extração quantitativa dos íons Cu(II), Fe(III), Zn(II) e Mn(II), sem alterar os níveis de selênio na amostra. Dessa forma,

o Se(IV) e o V(V) ficariam na fase aquosa, pois a faixa de pH em que esses íons são extraídos quantitativamente é praticamente a mesma. Não sendo extraído no processo, o íon V(V) continua sendo um interferente na determinação de selênio. Uma saída encontrada foi de mascarar o seu efeito com tartarato de sódio e potássio, cuja estrutura química é apresentada a seguir.⁽⁵⁰⁾

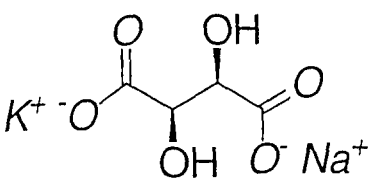


Figura 32 - Estrutura química do mascarante tartarato de sódio e potássio.

O tartarato de sódio e potássio atua no sentido de prevenir que o íon V(V) tenha efeito sobre o sinal analítico e conseqüentemente não provoque um erro na análise.

Depois de realizado este estudo para a eliminação dos interferentes procedeu-se novamente a uma análise em que agora se fez um processo de extração dos interferentes antes da mesma. A tabela 10 apresenta os resultados para esta análise sobre os dois pontos de concentração da curva analítica de calibração.

Tabela 10 – Resultados para estudo de eliminação de interferência.

[Se(IV)] _{adicionado} , µg mL ⁻¹	[Se(IV)] _{encontrada} , µg mL ⁻¹	%diferença
0,03	0,03 ₂₃	7,75
0,09	0,09 ₁₄	1,52

Analisando os resultados apresentados na tabela anterior conclui-se que o procedimento proposto é conveniente para eliminar os interferentes na determinação de selênio em cabelo. Dessa forma, o próximo passo foi a aplicação do método às amostras de cabelo.

IV.12) APLICAÇÃO DO MÉTODO A AMOSTRAS DE CABELO

IV.12.1) PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A preparação da amostra é de fundamental importância para o sucesso de vários métodos analíticos. Embora algumas técnicas analíticas (tal com XRF – fluorescência por raio-X e atomização eletrotérmica) nem sempre requeiram a dissolução da amostra sólida antes da medida, a maioria das medidas analíticas que fazem usos de métodos altamente sensíveis (UV/VIS, AAS, ICP-AES etc), são aplicados em soluções da amostra. Existem vários métodos para se proceder à decomposição de amostras sejam elas sólidas ou líquidas. Sendo assim, tem-se que o método de preparação da amostra a ser usado em determinada análise será governado não apenas pela natureza e concentração do analito, mas também pela técnica instrumental a ser utilizada. A tabela 11 apresenta os vários métodos que podem ser usados para a preparação de amostras para análise.⁽¹⁾

Tabela 11 – Métodos de decomposição de amostras para análise de elementos traço.

1 . Decomposição por via úmida

1.1 – em sistemas abertos

1.2 – em sistemas fechados (bombas de digestão)

→ Com aquecimento convencional

→ Com aquecimento por microondas

2 . Combustão

2.1 – em sistemas abertos

→ Carbonização seca

→ Carbonização a baixa temperatura

2.2 – em sistemas fechados

→ Frasco de combustão

2.3 – em sistema dinâmico

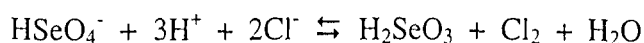
3 . Fusão

O método de decomposição utilizado neste trabalho foi decomposição por via úmida em sistema aberto. O procedimento adotado foi aquele recomendado por Huang et al.⁽⁴⁸⁾ na determinação de selênio em cabelo.

A decomposição de amostras de cabelo recomendada faz uso de soluções concentradas de $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$.

No processo de tratamento da amostra usa-se uma mistura fortemente oxidante de $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ e, ao final do processo requer-se uma etapa em que se faça a redução do Se(VI) a Se(IV) já que o método é específico para este último.

O procedimento mais comumente utilizado para a redução de Se(VI) a Se(IV) envolve o aquecimento da amostra digerida com uma solução de HCl. Este processo é bem documentado e recomenda-se que seja realizado em sistema aberto. A reação que ocorre pode ser escrita como segue:⁽⁵⁸⁾



Trabalhos anteriores têm estabelecido que a concentração ótima de HCl para uma redução quantitativa de Se(VI) a Se(IV) deve ser na faixa de 5 – 6 mol/L. A alta concentração de H^+ e Cl^- na solução 5 – 6 mol/L combinada com a baixa concentração de Cl_2 (o Se(IV) está no nível de traços e maioria do cloro formado é eliminado por evaporação) deslocará o equilíbrio da reação anterior para a direita. Uma concentração de HCl 6 mol/L permite uma recuperação de 100% do analito.⁽⁵⁹⁾

A recomendação de que a reação de redução deva ser realizada em um sistema aberto é pelo fato de que quando Se(VI) é reduzido pelo HCl a Se(IV), Cl_2 também é formado. Em sistemas fechados este Cl_2 pode então oxidar o Se(IV) a Se(VI).⁽⁶⁰⁾

Por se tratar de um sistema aberto, uma preocupação importante é com relação às perdas de analito por volatilização durante o processo de digestão. Para verificar tal problema foi realizado um estudo de perda do selênio durante o processo de decomposição. Neste sentido, foi feito um “tratamento de amostra” sem a presença da amostra (cabelo), porém quantidades conhecidas de selênio foram colocadas no sistema para se realizar um estudo de recuperação do mesmo. Este estudo foi realizado em três pontos da curva analítica de calibração (0,03; 0,06 e 0,09 $\mu\text{g/mL}$). A tabela 12 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 12 – Dados de recuperação de selênio para procedimento de abertura da amostra.

[Se(IV)] _{adicionado} , $\mu\text{g mL}^{-1}$	[Se(IV)] _{encontrada} , $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação(%)*
0,03	0,02 ₉₂	97,3
0,06	0,05 ₉₁	98,5
0,09	0,08 ₉₄	99,3

* Valores obtidos pelo mesmo procedimento que foi usado para a amostra, na ausência de cabelo (amostra).

Os resultados anteriores mostram que a perda de selênio no processo de abertura é desprezível e conclui-se que este método pode ser utilizado para preparação da amostra de selênio sem risco de perdas expressivas desse analito.

IV.12.2) ANÁLISE DE CABELO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Resultados analíticos são na maioria das vezes empregados no sentido de se obter informações relevantes sobre determinados sistemas. Dessa forma um método analítico não deve simplesmente fornecer valores numéricos mas também a confiabilidade que se pode ter nestas medidas. A validação de uma metodologia analítica vem assegurar essa confiabilidade nas análises, já que é nesta etapa que se estima a incerteza (erros) associada aos resultados que os procedimentos fornecem. As fontes de erros sistemáticos presentes em uma metodologia analítica podem ser classificadas em quatro categorias: (1) erros constantes; (2) erros proporcionais; (3) calibração/sistema e (4) interferência direta.⁽⁶¹⁾ Os principais erros que prejudicam a obtenção de resultados fidedignos e que são estimados em um processo de validação são os erros proporcionais (que variam com a concentração) resultando em uma significativa variação do sinal analítico por unidade de concentração do analito, também conhecido como efeito matriz, e erros constantes (que não variam com a concentração) e são derivados de variações significantes no sinal analítico sem ser atribuído ao analito. Os outros dois tipos de erros não podem ser diagnosticados estatisticamente.⁽⁶²⁾

Uma das limitações enfrentadas na validação de um método analítico é a falta de padrões de referência, que possuem um nível alto de exatidão e métodos de referência para comparação.^(63,64) Quando este for o caso o analista tem como

recurso utilizar a metodologia de adição de padrão para se fazer as devidas inferências estatísticas sobre o método.⁽⁶⁵⁾

Conforme descrito na literatura,⁽⁶⁶⁻⁷⁰⁾ a validação nesses casos pode ser realizada a partir de três conjuntos de experimentos para que se faça a aplicação do protocolo estatístico. Este procedimento se baseia na obtenção de três curvas de calibração: calibração com padrão (SC); calibração pelo método das adições padrão (AC) e calibração de Youden (YC).

A calibração padrão (SC) foi obtida a partir de uma série de soluções padrão de Se(IV). A calibração pelo método das adições padrão foi realizada a partir da utilização de uma massa constante de cabelo juntamente com quantidades crescentes de uma solução padrão de Se(IV). A calibração de Youden foi executada a partir de soluções contendo apenas a amostra de cabelo em diferentes concentrações (expressadas como quantidade de cabelo por unidade de volume de solução). Esta última calibração que se obtém, de acordo com a definição, não pode ser considerada como uma curva de calibração “verdadeira”, já que nenhum padrão é usado para obtê-la.

O estudo estatístico foi realizado sobre uma amostra de cabelo de um dos seis indivíduos analisados. Todos os indivíduos estão na faixa etária de 20 a 35 anos. A tabela 13 apresenta os resultados obtidos nas três calibrações.

Tabela 13 – Sinais analíticos obtidos para estabelecimento de SC, AC e YC.

Calibração	Concentração de Se(IV) padrão (µg/mL)	Concentração de amostra de cabelo (mg/mL)	ΔAbs*
SC	0	0	0,000 ₀
	0,035	0	0,042 ₀
	0,070	0	0,083 ₀
AC	0	8	0,023 ₂
	0,035	8	0,062 ₅
	0,070	8	0,106 ₅
YC	0	8	0,023 ₀
	0	10	0,028 ₉
	0	12	0,034 ₀

* Valores médios obtidos a partir de 5 replicatas.

As curvas SC e AC obtidas a partir dos resultados da tabela anterior, estão apresentas na figura 33.

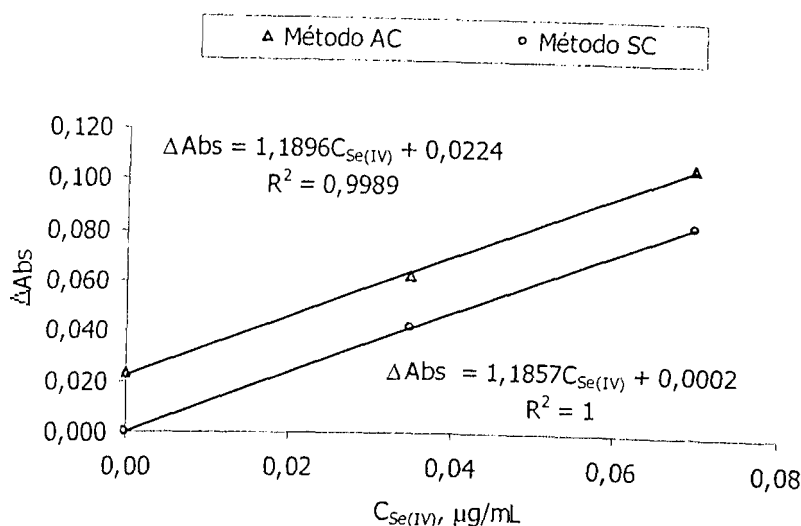


Figura 33 - Curvas analíticas de calibração obtidas pelo método padrão (SC) e pelo método de adição padrão (AC).

A comparação, usando o teste t-Student, dos coeficientes angulares das curvas obtidas das calibrações SC e AC pode levar a duas conclusões: a) a diferença entre dois coeficientes é significativa, indicando dessa forma a existência de erro sistemático proporcional, ou b) a diferença entre os dois coeficientes não é significativa e, neste caso a metodologia de adição padrão pode ser utilizada para validar a metodologia. No último caso, torna-se necessário então verificar se os coeficientes lineares de SC e YC são significativamente diferentes, que indicaria assim a existência de erro sistemático devido ao efeito matriz na amostra de cabelo.

O Apêndice 4 apresenta em detalhes o tratamento estatístico envolvido no teste t-Student para comparação dos coeficientes angulares das duas curvas apresentadas na figura 33. Com relação ao teste, levantam-se duas hipóteses denotadas por H_o (hipótese nula) e H_A (hipótese alternativa). Sendo curvas de equação geral, $y = bx + a$, $H_o : b_{SC} = b_{AC}$ e $H_A : b_{SC} \neq b_{AC}$. A hipótese nula (H_o) deverá ser rejeitada se $|t_{\text{calculado}}| \geq t_{\text{tabelado}}$. O valor encontrado no teste foi de 0,097. Consultando uma tabela de distribuição t de Student encontra-se um valor de 4,303 para 2 graus de liberdade. Dessa forma tem-se que:

$|t_{\text{calculado}}| < t_{\text{tabelado}}$ e H_o deve ser aceita.

A conclusão é a de que as calibrações SC e AC possuem coeficientes angulares estatisticamente iguais e, portanto não há evidência de erro proporcional no método para determinação de selênio.

A figura 34 apresenta a curva YC obtida na determinação de selênio em amostra de cabelo.

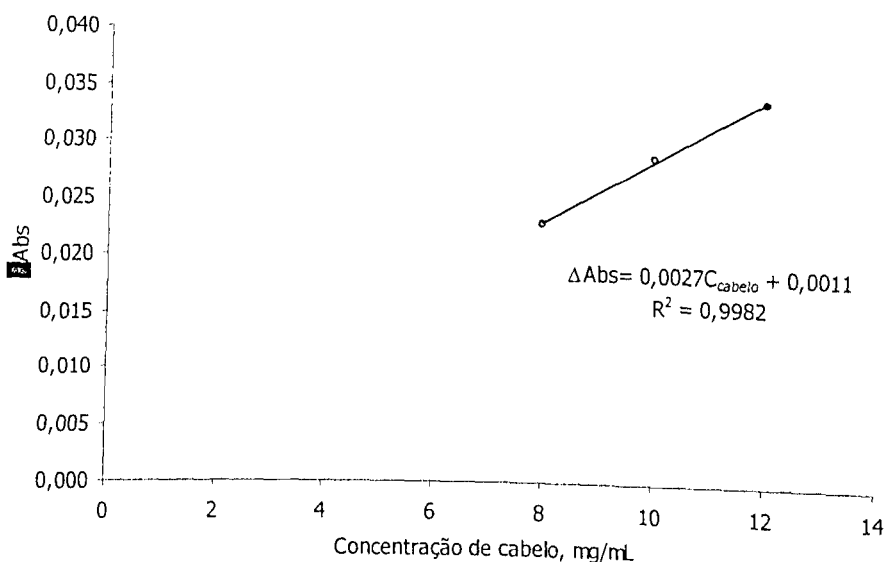


Figura 34 - Curva obtida pelo método de Youden (YC).

O próximo passo foi realizar o teste t para comparação dos coeficientes lineares de SC e YC. De modo análogo ao anterior tem-se que as hipóteses são as de que $H_o : a_{SC} = a_{YC}$ e $H_A : a_{SC} \neq a_{YC}$. O valor encontrado para t no teste foi de 0,360. Consultando uma tabela de distribuição t de Student encontra-se um valor de 3,182 para 3 graus de liberdade. Dessa forma tem-se que:

$|t_{calculado}| < t_{tabelado}$ e H_o deve ser aceita.

Este resultado significa que os coeficientes lineares das duas regressões são estatisticamente iguais, ou seja, não há diferença significativa entre eles, e conclui-se assim a inexistência de efeito matriz na determinação de selênio em amostras de cabelo por este método.

A exatidão do método foi então verificada comparando-se os valores de analito encontrado a partir de SC e AC usando o teste t para comparação de duas médias. Na tabela 14 é apresentada uma comparação entre os valores de Se(IV) encontrados no cabelo do indivíduo 1 pela SC e AC.

Tabela 14 – Comparação de duas médias de níveis de Se(IV) através do teste t obtidas através de SC e AC para níveis de selênio encontrados em amostra de cabelo do indivíduo 1.

$\Delta Abs \rightarrow$ Cabelo*	$C_{Se(IV)} - SC$ $\mu g/mL$	$C_{Se(IV)} - AC$ $\mu g/mL$
0,024	0,020	0,020
0,019	0,016	0,015
0,024	0,020	0,020
0,024	0,020	0,019
0,023	0,019	0,020

* 200 mg de cabelo para 25,00 mL de solução final.

A tabela 15 apresenta os resultados para a comparação executada no software Microcal™ Origin®, Versão 6.0.

Tabela 15 – Resultados da comparação entre médias dependentes realizadas no Origin 6.0.

Calibração	Média	Variância	N
SC	0,0190	$3,0 \times 10^{-6}$	5
AC	0,0188	$4,7 \times 10^{-6}$	5

$t = 0,53452$

$p = 0,62131$

Ao nível de 0,05;
as duas médias NÃO são significativamente diferentes.

Como se observa do resultado anterior não há diferença significativa entre o valor encontrado através de SC e AC. Sendo assim, o indivíduo 1 possui em média 2,36 μg de Se(IV) por g de cabelo.

Portanto, a partir de todas as considerações anteriores pode-se concluir que o método aqui utilizado possui exatidão suficiente para ser aplicado a amostras de

cabelo. Deixa-se claro aqui que este não é o procedimento mais recomendado para validação de um método e resultados melhores talvez poderiam ser obtidos a partir de padrões de referência. Entretanto, o procedimento aqui utilizado tem sido empregado com sucesso na validação de uma série de metodologias. ⁽⁶⁵⁻⁷⁰⁾

Na tabela 16, é apresentado ainda os resultados de análise de cabelo para mais 5 indivíduos.

Tabela 16 – Resultados da análise de selênio em amostras de cabelo.

Indivíduo	$\Delta\text{Abs} \rightarrow \text{Cabelo}$	$C_{\text{Se(IV)}}$	$C_{\text{Se(IV)}}$
		$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/g de cabelo}$
1	0,023	0,019	2,36
2	0,036	0,030	3,77
3	0,032	0,027	3,35
4	0,027	0,023	2,83
5	0,029	0,024	3,04
6	0,026	0,022	2,72

Os resultados da tabela anterior quando comparados com aqueles obtidos por Campos et al., ⁽⁴⁹⁾ apresentaram níveis de selênio comumente encontrados em humanos. Pozebon ⁽⁴⁴⁾ e colaboradores afirmam que concentrações normais vão de 0,002 a 6,6 μg de selênio por grama de cabelo. Dessa forma tem-se que os resultados obtidos estão dentro do um intervalo aceitável, garantindo assim que tais indivíduos apresentam níveis normais de selênio no organismo.

V) CONCLUSÕES

“Analytical chemistry is a metrological science that develops, optimizes and applies material, methodological and strategic tools of widely variable nature (chemical, physical, mathematical, biochemical, biological, etc.) which materialize in measuring processes intended to derive quality (bio)chemical information of both a partial [presence-concentration-structure of bio(chemical) analyte-species] and global nature on materials or systems of widely variable nature (chemical, biochemical and biological) in space and time in order to solve measuring problems posed by scientific, technical and social problems.” (72)

Valcárcel

A metodologia aqui proposta apresentou como características os seguintes parâmetros:

- LD - limite de detecção de 2,6 ng/mL de Se(IV)
- LQ - limite de quantificação de 11,6 ng/mL de Se(IV)
- faixa linear de 0,01 – 0,12 µg/mL de Se(IV)
- Sensibilidade analítica ($\gamma = m/s_s$, onde $s_s = 0,0015$) de 782,2.
- Curva analítica $\Delta Abs = 1,173C_{Se(IV)} + 0,0014$ $r^2 = 0,9993$

O estudo da concentração de H^+ , através da adição de HCl mostrou que os sistema reacional depende fortemente do pH, sendo a concentração ótima de H^+ (na forma de HCl) de 0,05 mol/L.

A otimização do sistema reacional utilizando planejamento fatorial apresentou evidências de que há uma interação entre H_3PO_2 e glioxal, e a metodologia de superfícies de resposta permitiu definir como concentrações ótimas dessas espécies 0,160 mol/L e 0,014 mol/L, respectivamente. Essas novas concentrações proporcionaram um ganho de 120 % no sinal analítico.

O estudo do efeito do ativador Br^- permitiu concluir que a concentração ótima deste no meio reacional é de 75 mmol/L. A utilização deste ativador permite um ganho de 84% no sinal analítico.

Aplicando-se o método proposto na análise de amostras de cabelo verificou-se que a extração com NaDDC 0,1% m/v a pH 10 foi eficiente para a eliminação das interferências de Cu(II), Zn(II), Fe(II) e Mn(II), enquanto a utilização de tartarato de sódio e potássio mascara a interferência de V(V).

A partir da análise estatística do método utilizando a metodologia das adições padrão, constatou-se que é viável a sua aplicação na determinação de Se(IV) em amostras de cabelo humano, uma vez que o método apresenta exatidão.

A adaptação do método ao sistema de AFCM permite uma frequência analítica de 50 a 55 amostras por hora, ou 18 amostras por hora com triplicatas. Além disso, devido ao fato de métodos catalíticos incluírem o tempo como uma variável experimental, há uma dificuldade na reprodutibilidade em processos estáticos. Por outro lado, a análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM), opera a tempo constante eliminando assim este inconveniente.

A metodologia aqui desenvolvida utiliza equipamentos simples e reagentes acessíveis à maioria dos laboratórios. No geral a metodologia é simples e eficiente na determinação de selênio a níveis de traço.

VI) PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

“Há um dom acima de todos os outros que torna o homem único entre os animais [...] o imenso prazer de exercer e aprimorar sua habilidade [...] A descoberta é uma dupla relação de análise e síntese juntas. Como análise, ela sonda à procura do que já existe [...] Como síntese, une as partes de maneira que a mente criativa transcenda o esqueleto simples fornecido pela natureza.”

Jacob Bronowski

Em virtude dos resultados apresentados pode se propor explorações deste método quanto a:

- 1) Elucidação do mecanismo da reação de catálise, pois a partir deste pode-se proceder a estudos de novos ativadores para serem aplicados no método e quem sabe aumentar ainda mais a sensibilidade deste e até mesmo diminuir o tempo de reação.
- 2) Outra proposta interessante seria quanto à aplicação desta metodologia a diferentes tipos de amostras para monitoramento das quantidades de selênio.

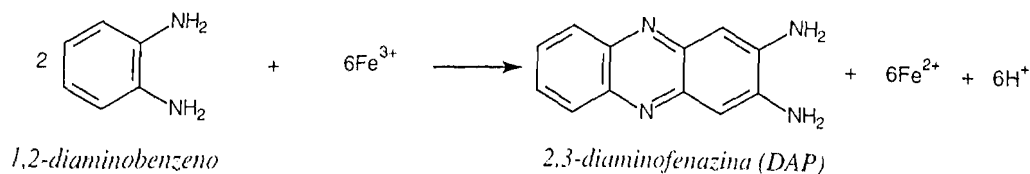
VII) APÊNDICES

VII.1) APÊNDICE 1

VII.1.1) Síntese do DAP– Primeiro Método

Neste procedimento, 11,82 g (44 mmol) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidas em 100 mL de água destilada e, a solução resultante foi adicionada a uma outra solução contendo 2,16 g (20 mmol) de 1,2-diaminobenzeno (Aldrich) e 1,4 mL de HCl em 100 mL de água sob agitação, à temperatura ambiente. Um precipitado vermelho forma-se imediatamente. Para recristalização, o precipitado foi filtrado e dissolvido em água quente. Ao se resfriar a solução o produto cristaliza na forma de agulhas. A seguir o precipitado foi filtrado e lavado com éter etílico várias vezes. O processo de recristalização foi repetido por mais duas vezes.⁽⁴⁶⁾

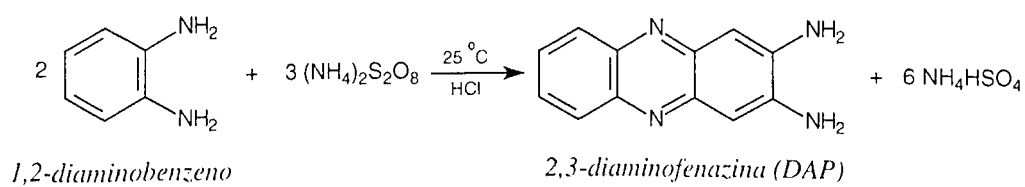
A reação envolvida na síntese é apresentada a seguir:



VII.1.2) Síntese do DAP – Segundo Método

Em um frasco de 125 mL 1,2-diaminobenzeno (0,944 g, 8,7 mmol) (Aldrich) foi agitado com uma solução de HCl 1 mol/L (25 mL) a temperatura ambiente. Persulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, (2,000 g, 8,7 mmol) (Reagen) dissolvido em 15 mL de água destilada, foi adicionado à solução da amina gota a gota com agitação por um período de 10 minutos, à temperatura de 23 ± 2 °C. A solução permanece com agitação por mais 30 minutos. Posteriormente foi deixada em repouso por uma noite a temperatura ambiente sem agitação. No dia seguinte o precipitado vermelho-marrom foi filtrado a vácuo e lavado várias vezes com THF (tetraidrofurano). O produto foi purificado por cromatografia em sílica gel usando-se como fase móvel uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 19:1$ (volume).

A reação de oxidação do 1,2-diaminobenzeno envolvida neste processo é apresentada a seguir:⁽⁴⁷⁾



SISBI/UFU
220662

VII.2) APÊNDICE 2 – Preparações e Purificações

VII.2.1) Preparo de soluções^{††} - Soluções de trabalho

→ Solução de limpeza da linha carregadora (HCl - 0,3 mol/L) – diluiu-se 25,5 mL de HCl concentrado (Dinâmica) em água até 1 litro.

→ Solução de DAP ($1,5 \times 10^{-4}$ mol/L) – pesou-se 0,0280 g de cloridrato de DAP, transferindo-o para um balão volumétrico de 1 litro. Adicionou-se aproximadamente 300 mL de água deionizada seguido de 17 mL de HCl concentrado (Dinâmica). Em seguida o volume foi completado a 1000 mL com água deionizada.

→ Solução de glioxal ($1,4 \times 10^{-2}$ mol/L) – transferiu-se uma alíquota de 0,60 mL de glioxal concentrado (40%) (Vetec) para um balão volumétrico de 50,0 mL, sendo em seguida completado com água deionizada até a marca.

→ Solução de H_3PO_2 ($16,0 \times 10^{-2}$ mol/L) - transferiu-se uma alíquota de 3,20 mL de H_3PO_2 (Synth) concentrado (50%) para um balão volumétrico de 50,0 mL, sendo em seguida completado com água deionizada até a marca.

→ Preparo de solução estoque de selênio 1 mg/mL – um padrão de 1000 mg de Se em HNO_3 6,3% (Merck) foi transferido para um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume posteriormente completado com água deionizada. Uma vez preparada esta solução foi armazenada em um recipiente de vidro âmbar e, as soluções padrões preparadas a partir de diluições de volumes apropriados desta.

→ Preparo de uma solução padrão de Se(IV) 0,06 $\mu\text{g/mL}$ com KBr (75 mmol/L) – transferiu-se 0,8927 g de KBr (Vetec) para um balão volumétrico de 100,0 mL. Em seguida adicionou-se aproximadamente 50 mL de água deionizada. Transferiu-se uma alíquota de 0,6 mL de uma solução de Se(IV) 1 $\mu\text{g/mL}$ sendo o volume posteriormente completado a 100,0 mL.

^{††} Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico.

→ Solução de NaDDC (0,1% m/v) – dissolveu-se 0,100 g de NaDDC (Vetec) em água a pH 10 em um balão volumétrico de 100,0 mL. Logo que preparada a solução foi transferida para um recipiente de plástico.

VII.2.2) Preparo de soluções - Soluções dos interferentes

Todas as soluções dos interferentes foram preparadas na concentração de 1000 µg/L, conforme descrito a seguir:

→ *Solução de Fe(III) (1000 µg/mL)* – preparada pela dissolução de 0,4840 g de FeCl₃.6H₂O (Vetec) em um balão volumétrico de 100 mL.

→ *Solução de Cu(II) (1000 µg/mL)* – preparada pela dissolução de 0,2116 g de CuCl₂ (Vetec) em um balão volumétrico de 100 mL.

→ *Solução de Mn(II) (1000 µg/mL)* – preparada pela dissolução de 0,2291 g de MnCl₂ (Reagen) em um balão volumétrico de 100 mL.

→ *Solução de Zn(II) (1000 µg/mL)* – preparada pela dissolução de 0,4550 g de Zn(NO₃)₂.6H₂O (Reagen) em um balão volumétrico de 100 mL.

→ *Solução de V(V) (1000 µg/mL)* – preparada pela dissolução de 0,2295 g de NH₄VO₃ (Vetec) em um balão volumétrico de 100 mL.

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções foram de grau analítico. As soluções para estudo de interferentes foram obtidas a partir da diluição de volumes apropriados das soluções estoque acima.

VII.2.3) Purificação do 1,2-diaminobenzeno (*o*-fenilenodiamina → *o*-PD)

Aminas aromáticas são muito susceptíveis à oxidação pelo próprio oxigênio do ar, sendo esta facilitada pela presença de luz. Quase sempre que se trabalha com alguma delas uma etapa de purificação antes de executar o procedimento desejado se faz necessária. No caso do *o*-PD não é diferente, ou seja, é necessário realizar a purificação do mesmo antes da síntese do DAP.

A técnica aqui utilizada para purificação do *o*-PD foi a recristalização com etanol. Esse procedimento deve ser repetido pelo menos três vezes, para se obter uma boa purificação.[⚡] A seguir descreve-se o procedimento:

→ Uma certa massa de *o*-PD impuro (coloração escura) é dissolvida em uma quantidade de mínima de álcool etílico a quente em um béquer de tamanho adequado. Uma vez totalmente dissolvido o sistema é deixado em repouso para que ocorra o resfriamento lento e conseqüentemente a recristalização. Ao se atingir a temperatura ambiente, o béquer é transferido para um banho de gelo. Procede-se com uma filtração a vácuo para separar os cristais de *o*-PD. Esse procedimento é realizado mais duas vezes. Ao final se obtém cristais amarelo-pálido de *o*-PD. A pureza do composto foi checada pela medida do ponto de fusão ($PF = 101 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$), cromatografia de camada delgada de sílica gel (fase móvel → ácido acético/butanol/água na proporção de 1:4:5 em volume) verificando então a presença de uma única mancha quando revelada com cristais de iodo ou sob luz ultravioleta (254 nm).

[⚡] Na verdade o analista é que deverá tomar a decisão de quantas purificações ele irá realizar, pois cada amostra poderá apresentar um teor diferente de impurezas. Sendo assim, baseando-se em algumas propriedades físicas toma-se a decisão quanto a continuar ou parar com a etapa de purificação.

VII.3) APÊNDICE 3^{§§}

Cálculos matriciais são bastante simples de se realizar com matrizes de pequenas dimensões, porém quando a dimensão desta aumenta os cálculos se tornam trabalhosos e desgastantes, sem levar em consideração a probabilidade de se cometer erros quando se tem um número grande de operações para se realizar.

Uma alternativa conveniente neste caso é a utilização de softwares para este fim. Além de fornecer resultados rápidos existe na rede mundial de computadores software gratuito para este fim. Um dos mais robustos e utilizados é o Scilab cuja versão utilizada e disponível atualmente é a 3.0. Este apêndice tem por objetivo apresentar alguns procedimentos básicos de introdução parâmetros e obtenção de resultados a partir deste software. A partir daqui tem-se a reprodução total da página de processamento do software, com exceção dos comentários.

scilab-3.0

Copyright (c) 1989-2004
Consortium Scilab (INRIA, ENPC)

Startup execution:

loading initial environment

A introdução da matriz ou vetor é realizada da seguinte forma:

- 1) A matriz é iniciada com um colchete [*.*
- 2) Os elementos são introduzidos por linhas e cada elemento é separado por um espaço.
- 3) Ao introduzir todos os elementos da primeira linha tecle <ENTER> para introduzir a segunda linha (observe que o colchete foi aberto apenas na primeira linha).
- 4) Após introduzir todas as linhas, na última fecha-se o colchete aberto na primeira. Este procedimento delimita o fim da introdução da matriz. Tecle <ENTER> para processar a matriz para o modo do programa rodar o cálculo.

Obs.: Para se introduzir potências ou raízes, procede-se do seguinte modo:

Exemplos: $\sqrt{2} \rightarrow 2^{0.5}$

$2^3 \rightarrow 2^3$

Observe que quando o programa processa a introdução dos dados ele já realiza a operação desejada.

^{§§} Os comentários realizados estão em *itálico* e não aparecem quando se executa o programa.

```
-->X = [1 -1 -1 1 1 1
-->1 1 -1 1 1 -1
-->1 -1 1 1 1 -1
-->1 1 1 1 1 1
-->1 0 0 0 0 0
-->1 0 0 0 0 0
-->1 0 0 0 0 0
-->1 -2^0.5 0 2 0 0
-->1 0 2^0.5 0 2 0
-->1 2^0.5 0 2 0 0
-->1 0 -2^0.5 0 2 0]
```

X =

```
! 1. - 1. - 1. 1. 1. 1. !
! 1. 1. - 1. 1. 1. - 1. !
! 1. - 1. 1. 1. 1. - 1. !
! 1. 1. 1. 1. 1. 1. !
! 1. 0. 0. 0. 0. 0. !
! 1. 0. 0. 0. 0. 0. !
! 1. 0. 0. 0. 0. 0. !
! 1. - 1.4142136 0. 2. 0. 0. !
! 1. 0. 1.4142136 0. 2. 0. !
! 1. 1.4142136 0. 2. 0. 0. !
! 1. 0. - 1.4142136 0. 2. 0. !
```

```
--> Introdução do vetor y.
-->y = [0.011
-->0.104
-->0.049
-->0.266
-->0.128
-->0.128
-->0.131
-->0.017
-->0.223
-->0.276
-->0.031]
```

```

y =
!   0.011 !
!   0.104 !
!   0.049 !
!   0.266 !
!   0.128 !
!   0.128 !
!   0.131 !
!   0.017 !
!   0.223 !
!   0.276 !
!   0.031 !

```

Neste ponto para se obter os coeficientes deve-se realizar a seguinte operação com a matriz.

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y$$

Para programa $X^t = X'$ e $(X^t X)^{-1} = \text{inv}(X^t X)^{-1}$, daí segue,

```
-->b = inv (X'*X)*(X'*y)
```

```
b =
```

```

!   0.129      !
!   0.0845352 !
!   0.0589411 !
!   0.0014375 !
! - 0.0083125 !
!   0.031      !

```

```
-->
```

O último resultado é a matriz com os coeficientes do modelo. Cabe aqui lembrar que o que foi apresentado é apenas uma pequena parte da potencialidade deste software. Uma descrição detalhada de como utilizar os recursos existentes neste programa, pode ser encontrada em um manual em pdf disponibilizado gratuitamente no seguinte endereço:

http://cermics.enpc.fr/scilab_new/site/Liens/intro/intro.html

VII.4) APÊNDICE 4

Muitos livros de Estatística não apresentam no seu conteúdo, tópicos relativos à comparação de coeficientes angulares e lineares de retas obtidas a partir de regressões lineares simples (regressão linear simples é aquela que considera apenas duas variáveis), quando se tem mais um conjunto de dados.

É muito comum possuir mais do que um conjunto de dados e ter de calcular uma equação de regressão para cada conjunto. Pode-se questionar então se os coeficientes angulares obtidos a partir de tais regressões são significativamente diferentes ou se eles podem ser estimados a partir de uma mesma população. Além disso, concluir que os coeficientes angulares não são significativamente diferentes, pode nos levar a querer saber se os vários conjuntos de dados pertencem a mesma população, ou seja, se os coeficientes lineares assim como os lineares são os mesmos.

A seguir é apresentada uma metodologia estatística para comparar os coeficientes angulares e lineares obtidos a partir de regressões lineares simples, utilizando o *teste t*.⁽⁷¹⁾

VII.4.1) Comparação entre dois coeficientes angulares

Um método simples para testar hipótese sobre a igualdade de dois coeficientes angulares obtidos a partir de duas populações envolve o uso teste *t Student* numa forma similar àquela utilizada para se comparar a diferença entre duas médias populacionais. O teste estatístico é

$$t = \frac{b_1 - b_2}{S_{b_1 - b_2}}$$

onde o erro padrão da diferença entre os dois coeficientes angulares é

$$S_{b_1 - b_2} = \sqrt{\frac{\left(\frac{S_{Y.X}^2}{\sum X^2}\right)_1}{\left(\sum X^2\right)_1} + \frac{\left(\frac{S_{Y.X}^2}{\sum X^2}\right)_2}{\left(\sum X^2\right)_2}}$$

e o quadrado da média do resíduo agrupado é calculado como sendo:

$$\left(\frac{S_{Y.X}^2}{\sum X^2}\right)_p = \frac{(\text{resíduo SS})_1 + (\text{resíduo SS})_2}{(\text{resíduo DF})_1 + (\text{resíduo DF})_2}$$

e os subscritos 1 e 2 referem-se às duas linhas de regressão que estão sendo comparadas. O valor crítico de t (t_{tabelado}) para este teste tem $(n_1-2) + (n_2-2)$ graus de liberdade (isto é, a soma dos dois graus de liberdade residuais), ou seja

$$v = n_1 + n_2 - 4$$

A tabela 17 a seguir apresenta os resultados obtidos da comparação entre os coeficientes angulares obtidos a partir de SC e AC.

Tabela 17 – Cálculo e interpretação do teste t para comparação dos coeficientes angulares das curvas SC e AC.

<i>Teste de hipótese nula para diferença entre duas populações de coeficientes angulares</i>	
$H_0: \beta_1 = \beta_2$	
$H_A: \beta_1 \neq \beta_2$	
AC	SC
$\Sigma x^2 = 0,00245$	$\Sigma x^2 = 0,00245$
$\Sigma xy = 0,00291$	$\Sigma xy = 0,00291$
$\Sigma y^2 = 0,00347$	$\Sigma y^2 = 0,00344$
$n = 3$	$n = 3$
$b = 1,1896$	$b = 1,1857$
$\text{Resíduo SS} = 3,71 \times 10^{-6}$	$\text{Resíduo SS} = 1,67 \times 10^{-7}$
$\text{Resíduo DF} = 1$	$\text{Resíduo DF} = 1$
$(s^2_{Y.X})_p = 1,94 \times 10^{-6}$	
$s_{b_1-b_2} = 0,0398$	
$t = 0,0968$	
$v = 3 + 3 - 4 = 2$	
$\text{Rejeitar } H_0 \text{ se } t \geq t_{\alpha(2), v}$	
$t_{0.05(2), 2} = 4,303$	
$\text{Aceita } H_0$	

VII.4.2) Comparação entre dois coeficientes lineares

O teste de hipótese nula para se comparar a igualdade de dois coeficientes lineares de duas regressões, necessita da definição de alguns parâmetros para serem usadas no teste t:⁽⁷¹⁾

Soma dos quadrados de X para a regressão comum

$$A_c = (\sum x^2)_1 + (\sum x^2)_2$$

Soma dos produtos cruzados para a regressão comum

$$B_c = (\sum xy)_1 + (\sum xy)_2$$

Soma dos quadrados de Y para a regressão comum

$$C_c = (\sum y^2)_1 + (\sum y^2)_2$$

Resíduo SS para regressão comum

$$SS_c = C_c - \frac{B_c^2}{A_c}$$

Resíduo DF para regressão comum

$$DF_c = n_1 + n_2 - 3$$

Resíduo MS para regressão comum

$$(s_{Y.X}^2)_p = \frac{SS_c}{DF_c}$$

Dessa forma o teste estatístico apropriado é

$$t = \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2) - b_c(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{(s_{Y.X}^2)_c \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}{A_c} \right]}}$$

E o valor crítico apropriado de t é aquele para $v = DF_c$.

A tabela 18 a seguir apresenta os resultados obtidos da comparação entre os coeficientes lineares obtidos a partir de YC e SC.

Tabela 18 – Cálculo e interpretação do teste t para comparação dos coeficientes angulares das curvas SC e YC.

Teste de hipótese nula para diferença entre duas populações de coeficientes lineares	
<i>H₀: As duas regressões possuem o mesmo coeficiente linear.</i>	
<i>H_A: As duas regressões não possuem o mesmo coeficiente linear.</i>	
SC	YC
$\overline{X}=0,0350$	$\overline{X}=10$
$\overline{Y}=0,0417$	$\overline{Y}=0,0286$
$\Sigma x^2=2,45 \times 10^{-3}$	$\Sigma x^2=8,000$
$\Sigma xy=2,91 \times 10^{-3}$	$\Sigma xy=2,20 \times 10^{-2}$
$\Sigma y^2=3,44 \times 10^{-3}$	$\Sigma y^2=6,06 \times 10^{-5}$
$n=3$	$n=3$
$a=0,0002$	$a=0,0011$
$b=1,1857$	$b=1,1857$
$Res\acute{d}uo\ SS_c=3,43 \times 10^{-3}$	
$Res\acute{d}uo\ DF_c=3$	
$(s^2_{\hat{Y}.X})_c=1,14 \times 10^{-3}$	
$A_c=8,0025$	
$B_c=0,0249$	
$C_c=0,00351$	
$b_c=0,00311$	
$t=0,3604$	
$Rejeitar\ H_0\ se\ t \geq t_{\alpha(2),\ v}$	
$t_{0,05(2),\ 3}=3,182$	
$Aceita\ H_0$	

VIII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vandecasteele, C.; Block, C. B.. *Modern methods for trace element determination*, 1st edition, John Willey & Sons: New York, 1994.
2. Correia, P. R. M.. Determinação simultânea de manganês/selênio e cobre/zinco em soro sanguíneo por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001.
3. Patriarca, M.; Menditto, A.; Di Felice, G.; Petrucci, F.; Caroli, S.; Merli, M.; Valente, C.. Recent Developments in Trace Element Analysis in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Diseases, *Microchem. J.*, **1998**, 59, p. 194-202.
4. Alaejos, M. S.; Romero, C. D.. Analysis of Selenium in Body Fluids: A Review, *Chem. Rev.*, **1995**, 95, p. 227-257.
5. Semenova, N. V.; Leal, L. O.; Forteza, R.; Cerda, V.. Multisyringe flow injection system for total inorganic selenium determination by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 486(2), p. 217-225.
6. Stoica, A. I.; Babaua, G. R.; Iorgulescu, E. E.; Marinescu, D.; Baiulescu, G. E.. Differential pulse cathodic stripping voltammetric determination of selenium in pharmaceutical products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 30(4), p.1425-1429.
7. Magalhães, C. E. C.. Emprego de Técnicas Espectroscópicas de Análise para a Determinação de Alumínio e Selênio em Amostras Alimentícias/Ambientais na Forma Líquida ou em Suspensões; *Tese de Doutorado*. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2000.

8. Ullrey, D. et al.. *Selenium in Nutrition*, National Academy Press: Washington, 1983.
9. Nelson, D. L.; Cox, M. M.. *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3rd edition, Worth Publishers: New York, 2000.
10. Yücel, D. et al.. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure, *Clinical Chemistry*, **1998**, 44, p. 148-154.
11. Tinggi, U.. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review, *Toxicology Letters*, **2003**, 137, p.103-110.
12. Lacerda, P.. *Manual Prático de Análise de Metais e Sais Minerais em Medicina Ortomolecular*, Organização Andrei Editora LTDA: São Paulo, 1995.
13. Taylor, E. W.; Ramanathan, C. S.; Jalluri, R. K.; Nadimpalli; R. G.. A Basis for New Approaches to the Chemotherapy of AIDS: Novel Genes in HIV-1 Potentially Encode Selenoproteins Expressed by Ribosomal Frameshifting and Termination Suppression, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37(17), p. 2637-2654.
14. Nakano, S.; Yoshii M.; Kawashima, T.. Flow-injection simultaneous determination of selenium(IV) and selenium(IV + VI) using photooxidative coupling of p-hydrazinobensenesulfonic acid with N-(1-naphthyl)ethylenediamine, *Talanta*, **2004**, 64(5), p. 1266-1272.
15. Mortari, S. R.; Saidelles, A. P. F.; Barin, J. S.; Flores, E. M. M.; Martins, A. F.. A Simple Procedure for Decomposition of Human Hair Using Polypropylene Vials for Selenium Determination by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, *Microchimica Acta*, **2004**, 148(3-4), p. 157-162.

16. Smrkolj, P.; Stibilj, V.. Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 512(1), p. 11-17.
17. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th edition, Wiley-VCH - John Wiley: New York, 2003. CD-Version.
18. Atkins, P. W.; Jones, L.. *Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente*, 1^a edição, Bookman: Porto Alegre, 1999.
19. Shriver, D. F.; Atkins, P.W.. *Inorganic Chemistry*, 3rd edition, Oxford University Press: New York, 1999.
20. Lee, J. D.. *Química Inorgânica não tão Concisa*, 5^a edição, Edgard Blücher: São Paulo, 1997.
21. Mottola, H. A.. *Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons: New York, 1988.
22. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition, Harcourt College Publishers: Philadelphia, 1996.
23. Harvey, D.. *Modern Analytical Chemistry*, 1st edition, McGraw-Hill: New York, 2000.
24. Gutiérrez Ponce, M. J. S.. Determinação Cinética de Cianeto Livre pelo Monitoramento Espectrofotométrico da Reação de *o*-Dinitrobenzeno com *p*-Nitrobenzaldeído, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
25. Pasquini, C.; Oliveira, W. A.. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia and phosphorus, *Anal. Chem.*, **1985**, 57(13), p. 2575-2579.

26. Yonehara, F. S.. Desenvolvimento de um Sistema em Fluxo para Pré-Concentração e Determinação Fotométrica de Mercúrio, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.
27. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.. Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta.*, **1975**, 78, p. 145-157.
28. Eiras, S. P.. Determinação catalítica de molibdênio em plantas, usando análise em fluxo contínuo monossegmentado com detecção espectrofotométrica, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1991.
29. Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; Javcintho, A. O.; Krug, F. J.; Bergamin, H.. Merging zones in flow injection analysis: Part 4. Simultaneous spectrophotometric determination of total nitrogen and phosphorus in plant material, *Anal. Chim. Acta.*, **1980**, 119, p. 305-311.
30. Ganzarolli, E. M.; Lehmkuhl, A. Q.; Roldão; R. R. de *et al.*. Automated potentiometric titrator based in monosegmented flow system, *Quím. Nova*, **1999**, 22(1), p.53-57.
31. Carlsson, K.; Karlberg, B.. Monosegmented micro-volume liquid-liquid flow-extraction system based on intermittent pumping and spectroscopic detection, *Anal. Chim. Acta.*, **2000**, 415, p. 01-07.
32. Aquino, E. V.. Extração Líquido-Líquido em Sistemas de Análise em Fluxo Monossegmentado: Investigação sobre o Efeito da Composição da Fase Orgânica e do Ligante Extrator, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2000.
33. Araújo, A. N.; Catita, J. A. M.; Lima, J. L. F. C.; Zagatto, E. A. G.. Monosegmented flow-analysis of slow enzymatic reactions: Determination of triglycerides in serum, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1998**, 360, p. 100-103.

34. Tumang, C. A.; Borges, E. P.; Reis, B. F.. Multicommutation flow system for spectrophotometric L-(+)-lactate determination in silage material using an enzymatic reaction, *Anal. Chim. Acta.*, **2001**, 438, p. 59-65.
35. Cavicchioli, A.; Gutz, I. G. R.. In-line TiO₂-assisted photodigestion of organic matter in aqueous solution for voltammetric flow analysis of heavy metals in water samples, *Anal. Chim. Acta.*, **2001**, 445, p. 127-138.
36. Andrade, J. C.; Eiras, S. P.; Bruns, R. E.. Study of the Mo(VI) catalytic response in the oxidation of iodide by hydrogen peroxide using a monosegmented continuous-flow system, *Anal. Chim. Acta.*, **1991**, 255, p. 149-155.
37. Smiderle, M.; Reis, B. F.; Rocha, F. R. P.. Monosegmented flow system exploiting multicommutation applied to spectrophotometric determination of manganese in soybean digests, *Anal. Chim. Acta.*, **1999**, 386, p. 129-135.
38. Dechary, J. M.; Kun, E.; Pitot, H. C.. Spectrophotometric Determination of Ethanedial, *Anal. Chemistry*, **1954**, 26, p. 449-452.
39. Tanaka, M.; Kawashima, T.; Miwa, H.. The determination of submicrogram quantities of selenium by means of a new catalytic reaction, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1964**, 37, p. 1085-1086.
40. Kawashima, T.; Tanaka, M.. Determination of submicrogram amounts of selenium(IV) by means of the catalytic reduction of 1,4,6,11-tetraaza-naphthacene, *Anal. Chim. Acta.*, **1968**, 40, p. 137-143.
41. Kawashima, T.; Nakano, S.; Tabata, M.; Tanaka, M.. Catalytic reactions as applied to trace analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1997**, 16(3), p. 132-139.
42. Bermejo-Barrera, P.; Muñiz-Naveiro, O.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A.. Experimental designs in the optimisation of ultrasonic bath-acid-

leaching procedures for the determination of trace elements in human hair samples by atomic absorption spectrometry, *Forensic Science International*, **2000**, 107, p. 105-120.

43. Rao, K. S.; Balaji, T.; Rao, T. P.; Babu, Y.; Naidu, G. R. K.. Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2002**, 57, p. 1333-1338.
44. Pozebon, Dirce, Dressler, Valderi L. and Curtius, Adilson J. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações, *Quím. Nova*, **1999**, 22(6), p. 838-846.
45. Carneiro, M. T. W. D.; Silveira, C. L. P.; Miekeley, N. et al. Intervalos de referência para elementos menores e traço em cabelo humano para a população da cidade do Rio de Janeiro – Brasil, *Quím. Nova*, **2002**, 25(1), p. 37-45.
46. Jang, D. H.; Yoo, Y. S.; Oh, S. M.. Electropolymerization Mechanism for Poly(*o*-phenylenediamine) (PPD) and Its Electrocatalytic Behavior for O₂ Reduction, *Bull. Korean. Chem. Soc.*, **1995**, 16, p. 392-397.
47. Premasiri, A. H.; Euler, W. B.. Syntheses and Characterization of Poly(aminophenazines), *Macromolecular Chemistry and Physics*, **1995**, 196, p. 3655-3666.
48. Huang, X.; Jie, N.; Zhang, W.; Yin, Y. et al.. Study on the spectrophotometric determination of micro amounts of selenium(IV) with 2,3-diaminonaphthalene in the presence of sodium dodecylsulphate, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1996**, 354, p. 195-199.
49. Campos, M. S.; Sarkis, J. E. S.; Müller, R. C. S. et al.. Correlation between mercury and selenium concentrations in Indian hair from Rondônia State,

Amazon region, Brazil, *The Science of The Total Environment*, **2002**, 287, p.155-161.

50. Anil, K.; Khopkar, S. M.; Chalmers, R. A.. *Solvents Extraction of Metals*, Van Nostrand Reinhold Company: London, 1970.
51. Barros Neto, B.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E.. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, Editora Unicamp: Campinas, 2001.
52. Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S.; *Statistics for experiments. A introduction to design, data analysis and model building*; John Wiley & Sons: New York, 1978.
53. Eiras, S. P.; Coscione, A. R.; Andrade, J. C.; Custodio, R.. *Métodos de Otimização em Química*. Net, Campinas, Abr. 1999. Disponível: http://www.chemkeys.com/bra/md/peeo_6/mdoeq_1/mdpf_3/mdpf_3.htm. Acesso em Julho-Agosto de 2004.
54. Bontchev, P. R.. Catalytic reactions - II: Activation, *Talanta*, **1972**; 19(5); p. 675-685.
55. Ohno, S.; Tanaka, M.; Teshima, N.; Sakai, T.. Successive Determination of Copper and Iron by a Flow Injection - Catalytic Photometric Method Using a Serial Flow Cell, *Analytical Sciences*, **2004**, 20, p. 171-175.
56. Kawashima, T.; Itabashi, H.; Teshima, N.; Kurihara, M.; Nakano, S.. Flow-Injection Determination of Copper(II) Based on Its Catalytic Effect on the Oxidative Coupling of 3-Methyl-2-benzothiazolinone Hydrazone with *N*-Ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline in a Micellar Medium, *Analytical Sciences*, **1999**, 15, p. 835-839.
57. INMETRO DOQ-CGCRE-008. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, 2002. RJ, Brasil.

58. Brindle, I. D.; Ługowska, E.. Investigations into mild conditions for reduction of Se(VI) to Se(IV) and for hydride generation in determination of selenium by direct current plasma atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **1997**, 52(2), p. 163-176.
59. Olivas R. M.; Donard; O. F. X.. Microwave assisted reduction of Se^{VI} to Se^{IV} and determination by HG/FI-ICP/MS for inorganic selenium speciation, *Talanta*, **1998**; 45(5), p. 1023-1029.
60. Rahman, L.; Corns, W. T.; Bryce, D. W.; Stockwell; P. B.. Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry, *Talanta*, **2000**; 52(5), p. 833-843.
61. Campíns-Falcó, P.; Verdú-Andrés, J.; Bosch-Reig, F.; Molíns-Legua, C.. Generalized H-point standard additions method for analyte determinations in unknown samples, *Analytica Chimica Acta*, **1995**, 302, p. 323-333.
62. Castells; R. C.; Castillo; M. A.. Systematic errors: detection and correction by means of standard calibration, Youden calibration and standard additions method in conjunction with a method response model, *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 423(2), p. 179-185.
63. Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J.; Rius, F. X.. Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 440(2), p.171-184.
64. Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J.; Rius, F. X.. Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 446, p.131-143.
65. Campaña, A. M. G.; Rodríguez, L. C.; Barrero, F. A.; Ceba, M. R.; Fernández, J. L. S.. ALAMIN: a chemometric program to check analytical

- method performance and to assess the trueness by standard addition methodology, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1997**, 16, p. 381-385.
66. Arrebola, A.; Bagur, M. G.; Sánchez-Viñas, M.; Gázquez, D.; Romero, R.; Camino, M.. Indirect determination of total yttrium and lanthanides by flame atomic absorption measurement of magnesium after extraction of their ternary complexes with purpurin (1,2,4-trihydroxyanthraquinone) and magnesium into isobutyl methyl ketone, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1998**, 13, p. 765-768.
67. Cruces-Blanco, C.; Carretero, A. S.; Boyle, E. M.; Gutiérrez, A. F.. The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs, *Talanta*, **1999**, 50(5), p. 1099-1108.
68. Zafra, A.; Olmo, M.; Suárez, B.; Hontoria, E.; Navalón A.; Vilchez, J. L.. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater, *Water Research*, **2003**, 37(4), p. 735-742.
69. Pulgarín, J. A. M.; Bermejo, L. F. G.. Determination of napropamide in technical formulations, soil and vegetable samples by sensitised fluorescence: validation of the method, *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 491(1), p. 37-45.
70. Fernández-Fígares, I.; Cuadros-Rodríguez, L.; González-Casado, A.. Effect of different matrices on physiological amino acids analysis by liquid chromatography: evaluation and correction of the matrix effect, *Journal of Chromatography B*, **2004**, 799, p. 73-79.
71. Zar, J. H.. *Biostatistical Analysis*. 3rd edition, Prentice Hall: New Jersey, 1974.
72. Valcárcel, M.. A modern definition of analytical chemistry, *Trends in analytical chemistry*, **1997**, 16(3), p. 124-131.